

# SOLUFIBRIN

Studien in vitro und in vivo  
mit harnstofflöslichem Fibrin

Marlene Weinzierl  
=

1963



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41548306\\_0021](https://archive.org/details/IA41548306_0021)





AUS DER I. MEDIZINISCHEN KLINIK  
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Direktor: Professor Dr. H. Schwiegk

SOLUFIBRIN

Studien in vitro und in vivo  
mit harnstofflöslichem Fibrin

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

MARLENE WEINZIERL  
Großköllnbach

München 1963



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Marx

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Schwiegl

Dekan: Prof. Dr. A. Hermann

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 1963

Dem Andenken meines Vaters,  
in Dankbarkeit meiner Mutter



# INHALTSANGABE

|                                                             | Seite |
|-------------------------------------------------------------|-------|
| <u>Einleitung</u>                                           | 6     |
| Verwendete Substanzen und Geräte                            | 7     |
| Angewandte Methoden                                         | 8     |
| <u>Experimentelle Ergebnisse</u>                            | 12    |
| I. EXPERIMENTE IN VITRO                                     |       |
| Das Fibrin                                                  | 12    |
| Vorbemerkungen über Fibrin                                  | 12    |
| Die eigene Fibrin-Herstellung                               | 16    |
| Das Solufibrin                                              | 20    |
| Lösungstheorien und Lösungsprodukte                         | 20    |
| Versuche zur Lysis                                          | 21    |
| Das Repolymerisat aus gelöstem Fibrin                       | 34    |
| Die Frage der Ursache für die Resynthese                    | 34    |
| Abhängigkeit und Beeinflußbarkeit des Resynthese-Vorganges  | 38    |
| Versuche zur Resynthese-Hemmung                             | 48    |
| II. TIEREXPERIMENTE                                         |       |
| Die Injektion                                               | 66    |
| Injektionsmittel                                            | 66    |
| Applikationsmodus                                           | 68    |
| Die immunologische Reaktion                                 | 68    |
| Allgemeines über die Antikörperbildung                      | 68    |
| Eigene Beobachtungen                                        | 71    |
| Nachweisbarkeit der Antikörper                              | 72    |
| Die pathologisch-anatomischen Veränderungen                 | 74    |
| Beschreibung allergischer und thrombo-embolischer Phänomene | 74    |
| Sektionsbefunde der eigenen Tiere                           | 77    |
| Diskussion der Befunde                                      | 89    |
| III. ANTISERA UND BLUTBEFUNDE post injectionem              |       |
| Allgemeine Blutuntersuchungen                               | 95    |
| Blutsenkungskontrolle                                       | 96    |
| Koagulationsuntersuchungen                                  | 99    |

|                                                       | Seite |
|-------------------------------------------------------|-------|
| Beobachtung der korpuskulären Elemente                | 100   |
| Die antikörperhaltigen Sera                           | 101   |
| Die Gewinnung und Aufbewahrung                        | 101   |
| Das Maß der Antikörperhaltigkeit                      | 101   |
| Die Spezifität der Antikörper                         | 105   |
| Die Nachweise mit den gewonnenen Antisera             | 111   |
| Nachweis der angewandten Antigene                     | 111   |
| Nachweis von in vitro hergestellten Fb-Abbauprodukten | 114   |
| Nachweis von in vivo entstandenen Fibrinbruchstücken  | 121   |
| <u>Schluß:</u>                                        |       |
| Zusammenfassung                                       | 129   |
| <u>Anhang:</u>                                        |       |
| Verzeichnis der Abkürzungen                           | 132   |
| Literaturverzeichnis                                  | 133   |

## Einleitung

Die Eigenschaft des Fibrin, auch in vitro für das Auge sichtbar zu entstehen, ist wohl dafür verantwortlich, daß dieses Protein schon seit langem und immer verfeinerter analysiert worden ist.

Seine vielfältigen und durch die geringste Änderung des Milieus beeinflussbaren Eigenschaften bringen es mit sich, daß das Fibrin trotz einer intensiven Forschung noch manches Rätsel aufgibt.

In der vorliegenden Arbeit sollten Probleme der Fibrin-Polymerisation, vor allem die Frage der Polymeraseaktivität von Thrombin, sowie der Löslichkeit von Fibrin unter Zusatz bestimmter Substanzen untersucht werden.

Die Beseitigung intravasaler Gerinnsel, wie sie die gezielte Thrombose-therapie durch Aktivierung des Profibrinolytins bzw. einer Vorstufe des Profibrinolytins (54, 85e) mit Steptokinase anstrebt, verlangt eine exakte Aussage über die Frische und damit die Angreifbarkeit eines Thrombus.

Da gleichzeitig mit der Entstehung eines Blutgerinnsels sein Abbau durch Plasmin einsetzt, könnten bei Thrombosen im strömenden Blut Fibrinabbau-produkte zu finden sein.

Gesetzt den Fall, Roka, Lasch und Witte (82a) - Astrup und Lüscher (53), neuerdings auch die russischen Hämatologen (81) sprechen von der Gefäßabdichtung durch Fibrin - hätten recht mit ihrer Behauptung, es liefen auch beim Gesunden ständig Fibrinbildung und Fibrinolyse im Gefäßsystem ab, so könnte doch der Abbau eines Thrombus, bzw. anderer Fibrinmassen, etwa bei Pneumonien einen quantitativ weit größeren Anteil an Fibrinbruchstücken im Blut bewirken.

Höher und allenfalls schon niedriger molekulare Fibrinabbauprodukte im Blut nachzuweisen, sollte vorwiegend Ziel dieser Arbeit sein. Nach R. Marx (57) schien es möglich, einen solchen Nachweis mit Antikörpern - von sensibilisierten Kaninchen gegen Fibrin-Monomeren gebildet - zu versuchen.

Da unseres Wissens noch nie, außer im Labor von R. Marx, Fibrin-Monomeren intravenös injiziert worden waren, war es auch interessant, die Frage einer möglichen Resynthese zu Fibringerinnseln und die daraus resultierenden pathologisch-anatomischen Veränderungen, besonders des Gefäßsystems, genauer zu studieren.

Um die genannten Ziele zu erreichen, mußten also Fibrinabbauprodukte hergestellt, Kaninchen injiziert und aus dem Blut der sensibilisierten Tiere antikörperhaltige Sera gewonnen werden. Pathologische Veränderungen der

Versuchstiere mußten beobachtet und durch Sektion, vor allem aber in histologischen Schnitten festgestellt werden.

## Verwendete Substanzen

- Antifibrinogenserum vom Kaninchen Nr. 2689 (Behringwerke, Marburg)  
Aqua destillata, z. T. auch A. bidest., entmineralisiert (als Lösungs- und Verdünnungsmittel)  
B<sub>6</sub>I (E. Merck AG., Darmstadt)  
Blut - Plasma - Serum vom Menschen bzw. Kaninchen  
Chondroitinschwefelsäure (Geigy, Basel)  
Diaethylbarbitursäure (pH 7, 6, Puffer)  
Dopa (L-  $\beta$  (3,4 Dioxyphenyl)-alanin (Suchardt, München)  
Eleparon Mucopolysaccharidpolyschwefelsäureester (Luitpoldwerk, München)  
Essigsäure (als Puffer)  
Evipan Natron (N- Methylzyklohexenylmethylbarbitursäure)  
Fibrinogen (Behringwerke, Marburg) verschiedene Chargen vom Rind  
Formalin 7%ige Lösung  
Harnstoff kristallin, rein  
 $\alpha$ -Heparin Novo (sterile Lösung von reinem Natrium-Mucoitinpolysulfat)  
Heparinoid G 31150/III 10%ig (Geigy)  
Kaliumpermanganat (KMnO<sub>4</sub>)  
Kalziumchlorid (CaCl<sub>2</sub>, 1,29n, m40)  
Kochsalzlösung, physiologisch (als Lösungs- und Verdünnungsmittel)  
Natrium-Citrat 3,8%ig  
Natronlauge (Na OH, als Puffer)  
Na-Oxalat 1,34%ig  
Paraffin  
Quecksilber II-Chlorid (Hg Cl)  
Reinagar, für Immunelektrophorese und Geldiffusion (Behringwerke)  
Streptokinase, Rein- (Behringwerk)  
Testserum Rapid Slide Test for Hypofibrinogenaemie, Hyland, Los Angeles  
Test-Thrombin, zur Ausführung von Antithrombinbestimmungen (Behringwerke)  
Thrombocid (Dr. Benend KG., München-Solln)  
Titriplex III Sequestrene = Äthyldiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (Merck, Darmstadt)  
Trasylol (Bayer 3380, Kalikreinaktivator)  
Trypure Novo kristallinisches Trypsin (Novo terapeutisk Laboratorium, Denmark)

Urokinase      Quality I (Leo Pharmaceutical Products, Denmark)  
Xylol

## Verwendete Geräte

Bechergläser  
Bunsenbrenner  
Brutschrank (37°C)  
Filterpapier  
Gefriertrockenapparat, Christ  
Holzstäbchen, rund, gelackt mit schwarzem Superalkydlack  
Kanülen      (Nr. 2, 12, 16, 18)  
Kühlschrank      (4°C)  
Kupferdrahthäkchen  
Meßzylinder      (100 ccm)  
Mikroskop      Phasenkontrast -  
Objekträger      (z. T. mit Deckgläschen)  
Petrischalen  
Pipetten      (0,1 bis 10 ccm, Ausblas- bzw. Auslaufpipetten und  
Leukopipetten)  
Reagenzgläser  
Spritzen      (2 ccm bis 20 ccm)  
Stanzröhrchen      (Durchmesser 0,6 und 0,4 mm)  
Thermostat      (nach Jürgens)  
Tiefkühltruhe (-18°C)  
Thrombelastogramm      (nach Hartert)  
Uhlenhuthröhrchen  
Wasserbad      (37°C)  
Wasserstrahlpumpe  
Zählkammern      Neubauer  
Zentrifuge      (bis 6000 Umdrehungen/Min.)  
Zentrifugengläser

## Angewandte Methoden

Herstellung von Solufibrin      (nach R. Marx (57))

### a) Fibrinbildung

Die aus Fibrinogen und Thrombin bzw. durch Resynthese aus harnstoffgelostem

Fibrin<sup>+)</sup> entstehenden Fibrinfäden werden auf ein Holzstäbchen aufgedreht und an der Glaswand ausgepreßt.

#### b) Lysis

Das Stäbchen mit dem Fibrinmantel wird in m 4,5 Harnstoff<sup>++)</sup> gesteckt. Die Lysiszeit beginnt mit dem Einlegen des Fibringerinnsels in den Harnstoff; sie gilt als beendet, wenn auch der letzte bläuliche Fibrinschleier verschwunden ist.

Die Sedimentationskonstanten von Solufibrin wurden mit der Ultrazentrifuge (Spinco) bestimmt.

### Bestimmung der Polymerisationszeit

Zur Bestimmung der Gerinnungs-, der Thrombin- und Repolymerisationszeit wurde die Häkchenmethode (58) verwendet. Hierbei wird die Zeit von der Zugabe des gerinnungsauslösenden Agens (Thrombin bzw. A. dest.) bis zur Bildung eines Fibrinfadens oder einer Flocke am auf und ab bewegten Häkchen gestoppt.

Als "Aqua dest. -Probe" gilt die Verdünnung von Solufibrin mit H<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:10; sie gilt als positiv, wenn es zur Ausflockung von Fibrin kommt.

### Bestimmung der entstandenen Fibrinmenge

Durch Multiplikation des nach Kjeldahl (8) bestimmten Rest -N- Wertes mit dem Faktor 5,8 wurde die Fibrinmenge errechnet.

### Injektion

Das gelöste und umgefällte Fibrin (bzw. Fibrinogen) wurde intravenös, z. T. auch subcutan oder intramuskulär Kaninchen injiziert.

Zur intravenösen Injektion mit gekochten Spritzen und Kanülen (Nr. 12) wurde Solufibrin meist 1:1 mit Citratblut des zu injizierenden Tieres 60 Min. incubiert.

Die Injektion erfolgte in die Ohrvenen. Das rasierte Ohr wurde mit Xylol eingerieben, wodurch die Venen, stark mit Blut gefüllt, leichter zu treffen waren. Es wurde in Richtung zum Herzen injiziert.

---

<sup>+)</sup> Durch Zusatz von 1%igem Sequestrene (in 100 ccm phys. NaCl wird unter Erhitzen ein Gramm gelöst und mit NaOH neutralisiert) wird der Ansatz Ca<sup>++</sup>-frei gemacht.

<sup>++)</sup> 27 Gramm Harnstoff in phys. NaCl ad 100 ccm gelöst.

Im Durchschnitt gelangten pro Min. 5 ccm des Injektionsgemisches in die Blutbahn.

Zu den wenigen subcutanen Injektionen wurden trockensterilisierte Kanülen, Stärke 16-18, verwendet, um den Stichkanal so klein wie möglich zu halten, damit er rasch verkleben und das Injektat (nicht incubiert!) nicht wieder ausfließen konnte.

### Tötung

Die Tiere wurden mit einer Überdosis von Evipan (200-600 mg/Tier), welches in physiologischer NaCl gelöst worden war, eingeschláfert.

### Sektion und histologische Untersuchung

Das getötete Tier wurde sofort abgehäutet, Abdomen und Thorax eröffnet. Die einzelnen Organe wurden genau inspiziert. Das Herz und die Blutgefäße sowohl des kleinen als auch des großen Kreislaufes wurden so weit möglich eröffnet und auf Gerinnselbildung untersucht. Aus den verschiedenen Organen entnommene Proben wurden in 7%iges Formalin gelegt.

Von den entnommenen Probeexzisionen wurden Paraffinschnitte, mit Hämatoxilin-Eosin oder nach Weigert (Fibrin) gefärbt, mikroskopisch untersucht (Priv. Doz. Dr. A. Georgii, München).

### Antikörpernachweis

a) Die Geldiffusion nach Ouchterlony: 1 g Agar (Reinagar, Behringwerke) wurde mit 100 ccm H<sub>2</sub>O 15 Min. lang (bis 100°) erhitzt, das verdampfte Wasser ersetzt und je 15 ccm dieser 1%igen Agarlösung in Petrischalen von 8 cm Durchmesser gegeben, wodurch ein Agar-Gel von 0,3 cm Dicke entstand. In diese Platte wurden Löcher von 0,6 oder 0,4 cm Durchmesser in einem Abstand von 0,4 cm gestanzt. Dieser Abstand erwies sich als nützlich, wollte man nach einer Inkubationsdauer von 12-24 Std. bei 37°C eine scharfe Präzipitationslinie erhalten.

Wir benutzten nicht die Originalanordnung von Ouchterlony (2), wonach 6 Löcher mit Testsubstanzen um ein einziges antiserumhaltiges angeordnet sind. Zwar hätte man dabei Serum einsparen können, mit unserer Anordnung aber in parallelen Reihen konnten wir auf einer Platte bis zu 25 Substanzen austesten, ohne daß die Klarheit der Ergebnisse darunter gelitten hätte.

Die ausgestanzten Agarplättchen wurden mit einer Pipette (0,1 ccm), welche an die Wasserstrahlpumpe angeschlossen war, herausgehoben, so daß

Löcher mit einem Rauminhalt von 0,084 bzw. 0,03 ccm entstanden.

Das eine der beiden benachbarten Löcher wurde mit 0,03 ccm Testserum (Ak) beschickt, das andere mit der gleichen Menge Testsubstanz (Ag). Als Testsubstanz wurde für den Fall des Antikörpernachweises immer das verwendete Antigen, also Solufibrin, oder auch Fibrinogen vom Rind verwendet. War die Reaktion positiv, so bildete sich an der Berührungsstelle der in den Agar diffundierenden Substanzen eine oder mehrere Präzipitationslinien aus.

Die Platten wurden nach 12-72 Stunden kontrolliert und ließen sich bei 4°C über Wochen mit nur geringen Veränderungen aufbewahren.

In Umkehrung der Zielsetzung wurde, bei bekanntem Antikörpergehalt des Serums, obige Methode zum Nachweis von antigenen Substanzen verwendet.

b) Die Immunelektrophoresen (nach Grabar und Williams (67)) wurden von Prof. Dr. H. E. Schultze, Behringwerke, Marburg, durchgeführt.

#### Allgemeine Blutuntersuchungen

a) Die Blutsenkungsgeschwindigkeit, nach Westergren (86)

b) Coagulationsuntersuchungen

1) Bestimmung der Prothrombinzeit (nach R. Marx und H. Bayerle) (58)

2) Thrombelastographie (nach Hartert) (31)

c) Zählung der Thrombozyten

nach dem Prinzip Feißlj - Lüdin (15), in der Modification nach S. Derlath (7)

d) Leukozytenzählung

## Experimentelle Ergebnisse

### Vorbemerkungen über Fibrin

Daß Fibrin unter der Einwirkung von Thrombin auf Fibrinogen entsteht, ist hinlänglich bekannt.

Fibrinogen - der Name wurde von Virchow geprägt -, das, wahrscheinlich aus der Leber stammend, natürlicherweise im Blut vorkommt, ist ein aus neutralen (Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Cystein, Cystin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin, Tryptophan), sauren (Asparaginsäure, Glutaminsäure) und basischen (Arginin, Lysin, Histidin) Aminosäuren zusammengesetztes Protein, das zu den Euglobulinen gehört (3; 20; 65). In der Elektrophorese wandert es mit oder nahe den  $\gamma$ -Globulinen (28; 48).

Die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung schwanken zwischen 350 000 und 700 000, nicht nur abhängig vom Ausgangsmaterial, sondern auch von der Präparation (3; 11; 14) und der Bestimmungsart.

Nach den neuesten Untersuchungen (4) dürfte für Human- und Rinderfibrinogen ein MGew. von 350 000 als gesichert gelten.

Als Länge des elipsoid-förmigen Moleküls wurden 500-700 Å berechnet (3; 11).

Der Isoelektrische Punkt dürfte bei 5,4 - 5,5 liegen. Die Löslichkeit in physiologischer Kochsalzlösung ist gut, während es in  $H_2O$  schlecht löslich ist. Diese Eigenschaft reiht es ebenfalls unter die Globuline ein (65).

Das Enzym (A. Schmidt) Thrombin ist in seiner chem. Struktur kaum bekannt (74).

Es entsteht aus dem im Blut vorhandenen Prothrombin - auch hier wird als Entstehungsort die Leber angegeben - durch Einwirkung von Thrombokinase, Acceleratoren und Autokatalyse bzw. "Co-Autokatalyse".

Das M. G. liegt bei 77 000; der Isoelektrische Punkt zwischen 4,2 - 4,8 (65). Es ist löslich in  $H_2O$  und wird von Säuren ( $pH < 3,8$ ), Basen ( $pH > 10$ ), Na-Bromid (65), Harnstoff (41; 90), Kaliumpermanganat (70), Formaldehyd (60; 65), Bakterien und Pilzen (25), ganz allgemein durch Reagenzien, welche oxydierend wirken und freie Aminogruppen angreifen (74), in seiner Wirksamkeit gestört. Inaktiviert wird es durch Antithrombin oder Antithrombin + Heparin (76). Dies geschieht auch in "reinen" Th-Präparaten, da sie immer noch diese inaktivierenden Substanzen enthalten (25).

Schließlich - und dies nicht am wenigsten - wird es am Fibringerinnsel adsorbiert (3).

Thrombin vermag die Verwandlung der  $10^5$ -fachen Menge seines Gewichts an Fibrinogen in Fibrin zu katalysieren (17).

Nach Scheraga und Laskowsky (65) ist eine Aussage über die Aktivität von Thrombin auf Grund der Gerinnungszeit unexakt, da hierbei auch Polymerisationshemmer mit erfaßt werden, ohne daß eine Schädigung des Th. vorliegen muß.

Als Angriffspunkt des Substrates Fgen für das Enzym Th. gelten bei Human Fgen Alanin, beim Rinderfgen Glutaminsäure.

Diese Aminosäuren, sowie Tyrosin, gelten als Endgruppen der beiden Fibrinogenarten (4).

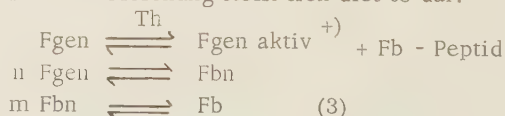
Die Tatsache, daß nur wenige der vielen Peptidbindungen in Fibrinogen angegriffen werden, spricht entweder für eine hohe Spezifität des Th. oder dafür, daß diese 2 oder 3 Bindungen, welche gespalten werden, von ganz besonderer Art sind. (Bailey und Bettelheim nach 65).

Als neues Endglied tritt nach der Spaltung immer Glycin auf (48). Dem Vorgang der Umwandlung von Fgen zu Fb mittels Th. liegt demnach eine Proteolyse und Decarboxylierung (65) zu Grunde.

Als Produkte entstehen "aktiviertes Fgen", Fbrinopeptide und Carbohydrate (3; 48; 65).

Die Fibrinmonomeren (= aktiviertes Fgen) vermögen unter geeigneten Bedingungen ( $\text{pH} > 4,85$ ,  $< 10$ ; Ionenkonzentration ( $\leq 0,15$ )) zu polymerisieren.

Hier gehen nun die Meinungen sehr auseinander. Die meisten Autoren (3; 41; 42; 47; 51; 52; 65) nehmen an, daß es sich bei der Aneinanderlagerung von Fb-Monomeren - sei es End zu End (3; 78; 91) oder Seit zu Seit (29; 91) - um eine Spontanreaktion eben dieser durch die Proteolyse entstandenen "Monomeren" handelt. Die dabei wirksam werdenden relativ schwachen Bindungskräfte seien offenbar  $\text{H} - \text{H}$  - Brücken (52; 65) und van der Wahl'sche Kräfte (48; 65; 68). In einer Gleichung stellt sich dies so dar:



Hierbei erscheint das Th nur als Peptide abspaltendes Proteolyticum und findet keinen Platz im Polymerisat (48; 65).

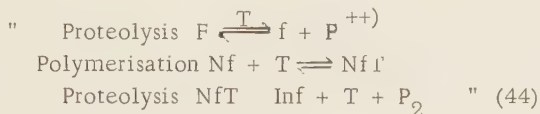
---

<sup>+) Fb-Monomeren</sup>

Dem gegenüber behaupten Ferry (nach 65), Seegers und Mitarbeiter (44), daß Th eine Polymerase sei.

Nicht nur Fgen, sondern auch Fb-Monomeren und das Fibringerinnsel seien ein Substrat für die Protease ("Enzym E") und die Polymerase ("Enzym C") Thrombin.

Darnach stellt sich die Reaktionsgleichung folgendermaßen dar:



(Hierzu muß bemerkt werden, daß Seegers (44) und Guest Ware (nach 65) mit sehr hohen Konzentrationen von Thrombin gearbeitet haben, wobei das Wirksamwerden von fibrinolytischen Verunreinigungs-komponenten nicht ausgeschlossen ist (65).)

Es ist vielleicht von Interesse, wieviele Wirkungshypothesen für das Thrombin schon aufgestellt wurden (65).

1. Denaturierung (Wöhlisch <sup>89</sup>) 1949)
2. Aktivierung von SH-Gruppen (Limbourg 1889, Spiro 1900)
3. Die Verbindung von Thrombin und Fibrinogen als auslösendes Moment (Momaerts 1945)
4. Thrombin: Protease und Polymerase (Ferry 1948, Seegers)
5. Thrombin: Protease (siehe oben!)

Die Frage, welche der beiden letztgenannten Vorstellungen nun die richtige sei, sollte uns noch sehr viel Kopfzerbrechen machen.

Fest steht, daß die Proteolyse <sup>+)</sup> , d.h. die Abspaltung von Peptid A und B unerläßlich ist für die nachfolgende Polymerisation (3; 65).

Bislang schien es, als sei zwischen aktiviertem Fibrinogen und nativem Fibrinogen außer einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes (5,5 5,6) kein Unterschied. Dies kommt daher, daß die angewandten Untersuchungen (Ultrazentrifuge, Dispersion des Lichtes, Viskosimetrie) zu grobe Methoden darstellen, um die feinen Unterschiede, welche ja durch die Proteolyse entstehen mußten, aufzudecken.

---

++) F ≠ Fibrinogen; T Thrombin; f Fibrinmonomeren; P = Peptide;  
 N irgendeine Zahl; NfT ein Enzymfibrinkomplex;  
 Inf inaktives Fibrin; P<sub>2</sub> Proteinabbauprodukte.

- +) Nach Scheraga und Laskowsky (65) wird das Fibrinogen durch die Freisetzung der Peptide aktiviert, in dem die für die Hydrogenbindung notwendigen funktionellen Gruppen (Donator und Acceptor) "demaskiert" werden, welche das Fibrinogen-Molekül unnutzbar besitzt.

Elektrophorese (Mihaly, nach 65), Differentialtitration (Mihaly) und Endgruppenanalyse (Bailay, nach 65) zeigten, daß Fibrinmonomeren um 13 negative Ladungen weniger<sup>+)</sup>  haben als Fibrinogenmoleküle. Die Decarboxylierung zeigt sich darin, daß z. B. Fb um 0,3 % weniger Hexose enthält als Fgen<sup>++)</sup>. Das MG dürfte für Fb um 7 000 - 10 000 unter demjenigen des Fgens liegen (65).

Die Quantität, wie auch die Qualität, des entstehenden Fibrins hängt weitgehend von den Versuchsbedingungen ab.

Die Fibrinausbeute ist - bei gegebener Fibrinogen- und Thrombinkonzentration - abhängig vom pH-Wert (19; 70), der Ionenkonzentration (17; 70) und der Temperatur (12; 19). Nach 45-60 Minuten ist sie aber (direkte Hemmung ausgeschlossen!) in allen Fällen fast 100% (17).

Die Beschaffenheit des Gerinnsels (16; 17; 19; 65) ist entweder von der Art des "fine" Typs, welcher durchsichtig, gelatinös, elastisch ist, oder aber "coarse", was besagt, daß die Flocke undurchsichtig, nicht zerteilbar und plastisch ist. Die erste Art entsteht im mehr alkalischen Milieu, während die zweite unterhalb des Neutralpunktes erzeugt wird (19).

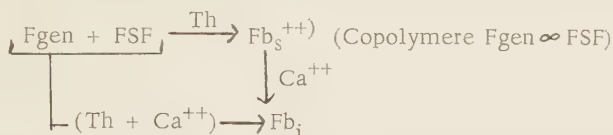
Von großer Bedeutung, gerade für die Untersuchungen in vitro, ist die Löslichkeit eines Fibringerinnsels in Harnstoff (42; 47; 49). Fibrin, welches aus reinem Fgen und Th hergestellt ist, löst sich leicht in Harnstoff (3-6 m) ((3) Fb<sub>s</sub>, s. unten), während ein normales Plasmagerinnsel harnstoffunlöslich (= Fb<sub>i</sub>, s. unten) ist, wenigstens innerhalb von 72 Stunden. Letzteres gilt für alle Gerinnsel, welche in Gegenwart von Ca-Ionen und einem Plasmfaktor - Lüscher hat ihn auch in Thrombozyten nachgewiesen (53) - dem sog. LL-Faktor, jetzt FS F oder "Fibrinase" genannt, entstehen. FSF ist in 20 000-facher Verdünnung noch wirksam (10).

Der "Fibrinstabilisizing-Factor" kommt normalerweise - es ist auch ein Fehlen dieses Faktors beschrieben (10) - im Plasma vor und ist für die Bildung des definitiven Fibrin im Blutgerinnsel (48) verantwortlich.

Fibrinase kommt als "Verunreinigung" auch in den meisten als rein beschriebenen Fgen-Präparaten vor (65; 3).

- 
- + ) Die fehlenden Ladungen dürften in den abgespaltenen Amid- und Kationen-  
gruppen der Peptide stecken.
  - ++) Erst in jüngerer Zeit (4) wurde festgestellt, daß von den Zuckern Galaktose  
und Mannose, welche 5 % des Gesamt-Fgen-Moleküls darstellen, bei der  
Umwandlung in Fb 10-15% verlorengehen; somit läge der Gesamt-Hexose-  
gehalt von Fb um 0,5-0,75% unter demjenigen des Fgen. Den letzten For-  
schungsergebnissen nach (85 h) zeigen Fibrinogen und Fibrin gleiche Hexose-  
werte von 1,61-1,63%, während die Fibrinpeptide hexosefrei seien.

Ihre Wirkung kommt der einer Verfestigung <sup>+</sup>) des Gerinnsels gleich. Sie beruht auf der Eigenschaft eines Katalysators oder Initiators zur Bildung von Disulfidbrücken (52).



Der Isoelektrische Punkt von harnstoffgelöstem Fibrin liegt wegen der Freisetzung saurerer Aequivalente höher als der der Ausgangs-Fgen-Lösung (4).

## Fibrinherstellung

Da wir möglichst spezifische Antikörper (Ak) gegen Fibrin bzw. Fibrinabbau-  
produkte anstreben, müßte das verwendete Antigen (Ag) so rein wie irgend  
möglich und so konzentriert wie nötig appliziert werden. Die verwendeten  
Fgen-Chargen (Nr. 588, 565, 628, 637 A, 640, 641 A, 641 C, 643C, 654)  
waren durchwegs mehr oder weniger FSF-haltig; ebenso das Thrombin. Letz-  
teres sollte in möglichst geringen Dosen verwendet werden, um kein freies  
Th i. v. zu geben und die damit verbundenen Veränderungen im Versuchs-  
tier zu vermeiden (30; 73; 81).

Die Auflösung des Fgen bei 37° in physiologischer Kochsalzlösung  
(phys. NaCl) beanspruchte 30-60 Minuten. Besonders schwer löste sich die  
Charge 588 - nach Angaben der Behringwerke war sie prothrombinhaltig<sup>+</sup>).  
60 mg "Rein-Fgen Behringwerke" wurden nicht, wie vom Hersteller vorge-  
schlagen, in 10 ccm phys. NaCl gelöst, es wurde vielmehr eine 1%ige Lösung  
verwendet.

Die für unsere Zwecke zur Gerinnung notwendige Thrombin-  
menge wurde festgestellt:

|                            | I | II | III     | IV    |
|----------------------------|---|----|---------|-------|
| ccm Fgen 1 %               | 1 | 1  | 1       | 1     |
| i. E. Th (in 0,7ccm) 20    |   | 10 | 2       | 1     |
| Ger. -Zeit (inMin.) 1' 5'' |   | 2' | 3' 52'' | 8-13' |

+) Lorand (51) nennt das FSF "a cement between the fibrin units"

++)  $\text{Fb}_s$  = Fb soluble;  $\text{Fb}_i$  = Fb insoluble

+) Wir versuchten durch Ausschütteln mit  $\text{BaSO}_4$  (100 mg/ccm Fgen das  
Prothrombin zu entfernen, mußten aber einsehen, daß der Verlust an Fgen  
(50%) in keinem Verhältnis stand zur Verlängerung der Prothrombinzeit  
von 9' 30'' auf 10' 30''.

Alle Ansätze blieben 12 Stunden bei Zimmertemperatur (Zi. T.) stehen, dann wurden die Gerinnsel entfernt, der ausgepreßte Rückstand auf die erhaltene Th-Aktivität getestet.

#### Thrombin im Rückstand:

|                    | Ir  | IIr | IIIr | IVr |
|--------------------|-----|-----|------|-----|
| ccm Fgen 1 %ig     | 0,1 | 0,1 | 0,1  | 0,1 |
| Rückstand aus I-IV | 0,1 | 0,1 | 0,1  | 0,1 |
| Gerinnung          | +   | +   | (+)  | -   |

Ergebnis: pro ccm.Fgen wurde 1 E Th<sup>+</sup>) verbraucht. Höhere Mengen an Th beschleunigen zwar die Gerinnung, bleiben aber im Endeffekt sinnlos, ja es ist sogar die Möglichkeit einer erhöhten Occlusion des Th im Gerinnsel (61) gegeben.

Die Menge von 1 E Th<sup>+</sup>) entspricht etwa 0,7 ccm einer Lösung von 60 E (= 1 Ampulle Test-Thrombin, Behringwerke) in 40 ccm Aqua dest.

Für Ferment-Reaktionen gilt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit abhängig ist von der Konzentration der Reaktionspartner, d.h. bei gleichbleibender Fermentkonzentration von der Zahl der Substrat-Moleküle (48).

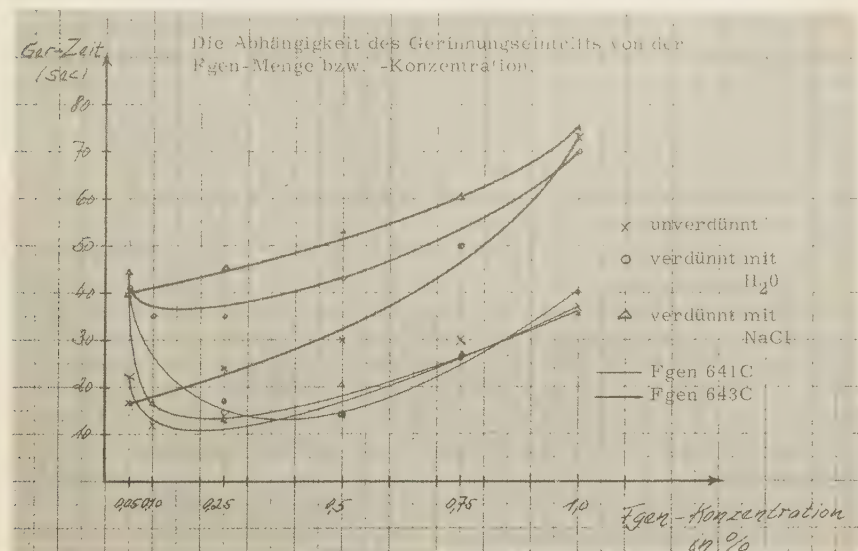
Die Gerinnungs-Zeit in Sekunden bei gleichbleibendem Th und veränderten FgenMengen.

Tabelle siehe Seite 18.

---

+) 1 i. E. Thrombin ist - nach einer Definition des National Institut of Health - der Anteil an Th, welcher eine standart. Fgen-Menge bei 28° C in 15 sec zur Gerinnung bringt.

|                                   |      | a)   | b)   | c)   | d)   | e)   | f)   |                                                                         |
|-----------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|-------------------------------------------------------------------------|
| Fgen                              | %ig  | 1    | 0,75 | 0,5  | 0,25 | 0,1  | 0,05 |                                                                         |
|                                   | :ccm | 0,2  | 0,15 | 0,1  | 0,05 | 0,02 | 0,01 |                                                                         |
| Verdünnungs-<br>flüssigkeit:      |      | 0,0  | 0,05 | 0,1  | 0,15 | 0,18 | 0,19 |                                                                         |
| Unverdünnt:                       |      |      |      |      |      |      |      | G<br>e<br>r<br>i<br>n<br>n<br>u<br>n<br>g<br>s<br>c<br>z<br>e<br>i<br>t |
| (641 C)                           |      | 37   | 30   | 14   | 14   | 12   | 22   |                                                                         |
| (641 C)                           |      | 36,5 | 30,7 | 16   | 14,5 | 13   | --   |                                                                         |
| (643 C)                           |      | 13   | 50   | 30   | 24   | -    | 17   |                                                                         |
| Verdünnt mit<br>H <sub>2</sub> O: |      |      |      |      |      |      |      |                                                                         |
| (641 C)                           |      | 40   | 26   | 14   | 16,7 | 35   | 41   |                                                                         |
| (641 C)                           |      | 42   | 24   | 15,5 | 20   | 34   | 40   |                                                                         |
| (643 C)                           |      | 70   | 50   | 43   | 35   | -    | 40   |                                                                         |
| Verdünnt mit<br>phys. NaCl:       |      |      |      |      |      |      |      |                                                                         |
| (641 C)                           |      | 35,2 | 26,5 | 20,4 | 13,5 | 16,5 | 44,3 |                                                                         |
| (641 C)                           |      | 35   | 26,6 | 21,5 | 14   | 15   | 21,5 |                                                                         |
| (643 C)                           |      | 75   | 50   | 53   | 45   | -    | 40   |                                                                         |



Die Ger. -Zeit verlängert sich proportional der Fgen-Konzentration (19). Da die Menge des Substrats, d.h. die Zahl der Fgen-Moleküle in den 3 Versuchsserien in gleicher Weise verändert wurde und das Th gleichblieb, müßten die 3 Kurven übereinstimmen. Der Verlauf der Kurven ist ähnlich, aber nicht kongruent. Die relativ höhere Ger. -Zeit bei Verdünnung des Fgen (sei es mit H<sub>2</sub>O oder phys. NaCl) spricht dafür, daß die Polymerisation ein von der Fermentwirkung (Proteolyse) nur indirekt abhängiger Vorgang ist. Vielleicht ist die Verzögerung so zu erklären, daß die elektrostatischen Anziehungskräfte der aktivierten Fgen-Moleküle bei der größeren Entfernung nur verzögert zur Aneinanderlagerung<sup>+) der einzelnen Moleküle führen.</sup>

Die Löslichkeit des erhaltenen Fibrins sicherzustellen, mußte mindestens einer der beiden Faktoren FSF und Ca<sup>++</sup> unwirksam gemacht werden; denn nach Laki und Lorand (42) sind "2 Faktoren zusammen, Ca<sup>++</sup> und FSF, für die Unlöslichkeit des Gerinnsels in Harnstoff verantwortlich".

Die Ausschaltung des LL-Faktors wurde mit geringem Erfolg versucht. Die benötigte Menge an Ca<sup>++</sup> -Fänger Sequestren war im Labor (Prof. Marx) bereits vorgetestet und mit 0,1 ccm/ccm Fgen, einer 1 %igen Lösung, angegeben worden.

Somit wäre der Grundansatz für alle Versuche:

1 ccm Fgen 1 %ig (Behringwerke)

0,1 ccm Sequestrene 1 %ig

0,7 ccm Thrombinlösung (= 1 E) (Behringwerke)

oder ein Vielfaches davon.

Da bei 37° die Fibrinausbeute geringer war, und auch fermentative Prozesse die Reaktion beeinflussen können (65), wurde meist bei Zi. T. gearbeitet.

Hierbei kam es nach ca. 5 min. zu einer bläulichen Trübung, nach 8 min. zeigte sich an der Wand des Reagenzglases oder Uhlenhuthröhrchens ein lockerer Fibrinbelag. Die Fäden wurden in bereits beschriebener Weise (s. S. 9) 45-60 min. auf ein gelacktes Holzstäbchen aufgedreht, so daß sich allmählich ein dichter Fibrinmantel darum bildete.

Die Menge des so gewonnenen Fibrins betrug etwa 8 mg pro Ansatz (Vergl. : 12). Die Fb-Menge wurde aus dem Rest-N berechnet. Der pH-Wert um 6 wurde beibehalten, um nicht unnötig Puffer beizumengen und vor allem, da durch das hierbei entstehende gröbere Maschenwerk Proteine anderer Art nicht so leicht eingeschlossen und zumal zu Beginn der Polymerisation leichter ausgepreßt werden können (61). Nach C. van Zandt Hawn (83) zeigen sich hierbei im Elektronenmikroskop nicht so viele amorphe, unpolymerisierte Proteine wie bei höherem pH.

<sup>+) Nach Köppel (nach 29) in 3 Polymerisationsschritten: 1. polare, 2. laterale Verbindung der Monomeren zu Fb-Fasern, die 3. Fb-Faserbündel bilden.</sup>

Wir haben also ein System, das konzentriert ist, was Fgen bzw. Fb angeht, arm an Thrombin, so rein<sup>+</sup>) wie möglich<sup>++</sup>) und gut löslich ist.

## Solufibrin

Die Auflösung eines Fb-Gerinnsels geschieht physiologischerweise vorwiegend durch Plasmin.

Dieses sowie auch die Fermente Streptokinase (als Aktivator des Profibrinolytins), Urokinase und Trypsin - von Seegers auch Thrombin E (73)-(als Proteasen) werden als in vitro wirksame Fibrinolytika verwendet.

An chem. einfacheren Substanzen vermögen Säuren, Guanidin-Hydrochlorid, Histamin Dihydrochlorid, LiCl, LiBr, NaBr, NaJ und vor allem Harnstoffe (3; 69; 71) "reine" Fbringerinnsel zu lösen.

Vom Harnstoff ist bekannt, daß er Wasserstoffbrücken in Proteinen aufbricht (35; 65), da er selbst eine starke Tendenz hat, H-H-Bindungen zu bilden (12); er soll auch elektrostatische Kräfte angreifen (71), während er Disulfidbrücken nicht zu spalten vermag ( $F_1 \neq$  Fibrin insoluble!).

Die Fibrin-Ketten werden von Harnstoff verschiedener Konzentration depolymerisiert.

Es entstehen zunächst Fb-Polymeren, endlich Fb-Monomeren von annähernd gleicher Gestalt und Größe, wie "aktiviertes" Fgen (79). Auch die Viskosität der Lösung gleicht der der verwendeten Fgen-Lösung (50).

Setzt man jedoch das Fb einer intensiveren, länger andauernden Harnstoffwirkung aus, so kann es zur Denaturierung der Fb-Monomeren kommen. Während man zunächst in der Ultrazentrifuge (UZ) Sedimentationskonstanten  $S_{20W}$  von 8-9 S, und zwar pro Lösung nur eine Sedimentationsbande erhält, wie bei Fgen (69), treten später sehr breite Sedimentationsdiagramme auf, besonders bei Harnstoffkonzentrationen über m 4 (71).

Es werden aber auch Präparate von gelöstem Fibrin mit 2 Sed. K. be-

---

+) Die Bezeichnung "rein" ist hier kaum am Platz. Da aber auch für öfter umkristallisierte, also chemisch reine Antigene die Bildung verschiedenartiger Antikörper beschrieben ist (36), wollten wir mit dem Reinheitsgrad, wie er nach der Umfällung (s. S. 34) bestand, zufrieden sein.

++) Die Anwendung von Fb-Monomeren größerer Stabilität und Reinheit, hergestellt nach Donelly (nach 47) ist wegen des Gehaltes an NaBr für unsere Tierversuche nicht möglich.

schrieben, und zwar von Laskowski/Scheraga (46; 65) für Fb in 30 %igem Harnstoff. S 8,5 und S 24, von Shulman (69) bei Reduktion der Harnstoff-Konzentration von m 3,5 auf m 2,3; S 9 und S 25.

Die Uneinheitlichkeit der in der Literatur angegebenen S-Werte ist durch die immer irgendwie veränderten Versuchsbedingungen erklärlich (61). Dies macht einen Vergleich mit den in eigenen Versuchen gewonnenen Ergebnissen unmöglich. (s. S. 37)

### Versuche zur Lysis:

Die von uns verwendete Harnstofflösung war 4,5 molar. (27 g  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  in 100 ccn mit phys. Kochsalzlösung aufgelöst. Die Lösung wurde für jede Versuchsreihe frisch angesetzt.)

Die Fibrinolyse konnte gut beobachtet werden.

Bewegt man das Stäbchen mit dem Fibrinmantel, so lösen sich Schlieren ab; auch Luftbläschen, welche in das Gerinnsel miteingespinnen waren, steigen auf.

Es muß hier gesagt werden, daß die Exaktheit der Endpunktbestimmung nicht ganz befriedigend ist.

Ermittlung der für die Lysis günstigen Bedingungen:

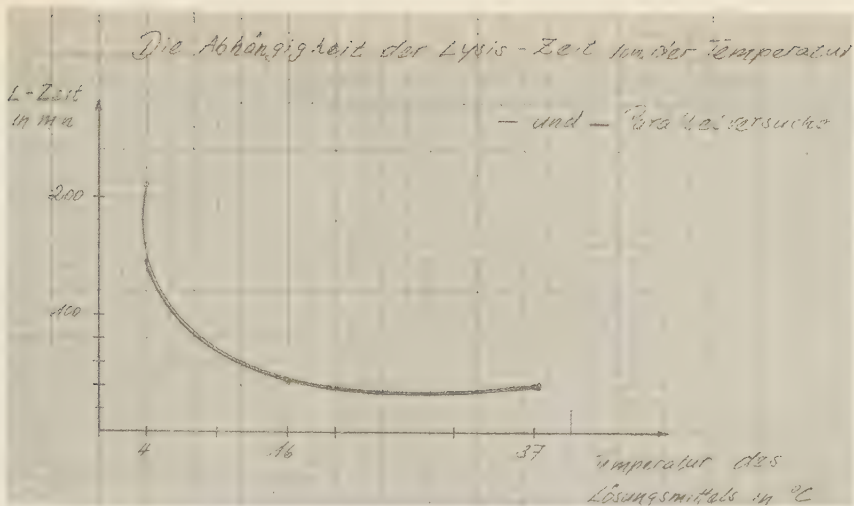
#### 1. Temperaturabhängigkeit

Untersucht wurden nur die für Versuche größeren Umfangs bedeutenden Temperaturen

|              |            |
|--------------|------------|
| Kühlschrank  | = 4°       |
| Zimmer       | = 16 - 20° |
| Wärmeschrank | = 37°      |

Aus 24 Normalansätzen wurden, wie beschrieben, Fbringerinnsel gewonnen und in je 2 ccn 4,5 m Harnstoff gegeben. 12 davon wurden sich selbst überlassen<sup>a)</sup>, die übrigen alle 5 Minuten geschüttelt<sup>b)</sup>.

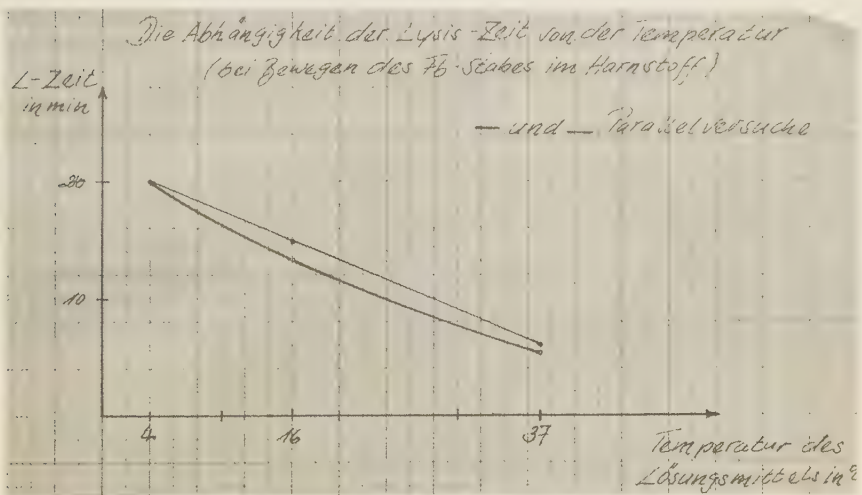
|               |      |      |     |     |     |     |
|---------------|------|------|-----|-----|-----|-----|
| a) Temperatur | 4°   |      | 16° |     | 37° |     |
| Lysis-Zeit    | 145' | 210' | 43' | 45' | 38' | 40' |



Diese Zeiten erschienen uns sehr lange, wir halfen mechanisch nach.

b)

| Temperatur | 4°      | 16°     | 37°        |
|------------|---------|---------|------------|
| Lysis-Zeit | 20' 20' | 13' 15' | 5' 12'' 6' |



Durch Bewegen des Fb-Stabes wurden immer neue Gerinnseloberflächen für die Harnstofflösung zugänglich; dies führt zu einer beschleunigten Lysis.

## Ergebnis

Die Lysiszeit ist der Temperatur umgekehrt proportional. (Vergl. 65 und 14).

Da jedoch bei 37° fermentfibrinolytische Vorgänge stärker einwirken können - die geringe Repolymerisation des "37° Solufibrins" beweist es -, wird bei Zimmertemperatur gearbeitet; das Fibrinstäbchen wird in bestimmten Zeitabständen bewegt.

Zunächst beobachteten wir die Lysis in Harnstoff unter den genannten Testbedingungen bei Einwirken verschiedener Substanzen.

1) Beobachtungen der Lysis bei Zusatz von Serum bzw. Plasma wurden, da die dabei interessante Komponente FSF sich in unseren Fgen- bzw. Th-Präparaten als Verunreinigung befindet, eingehend untersucht.

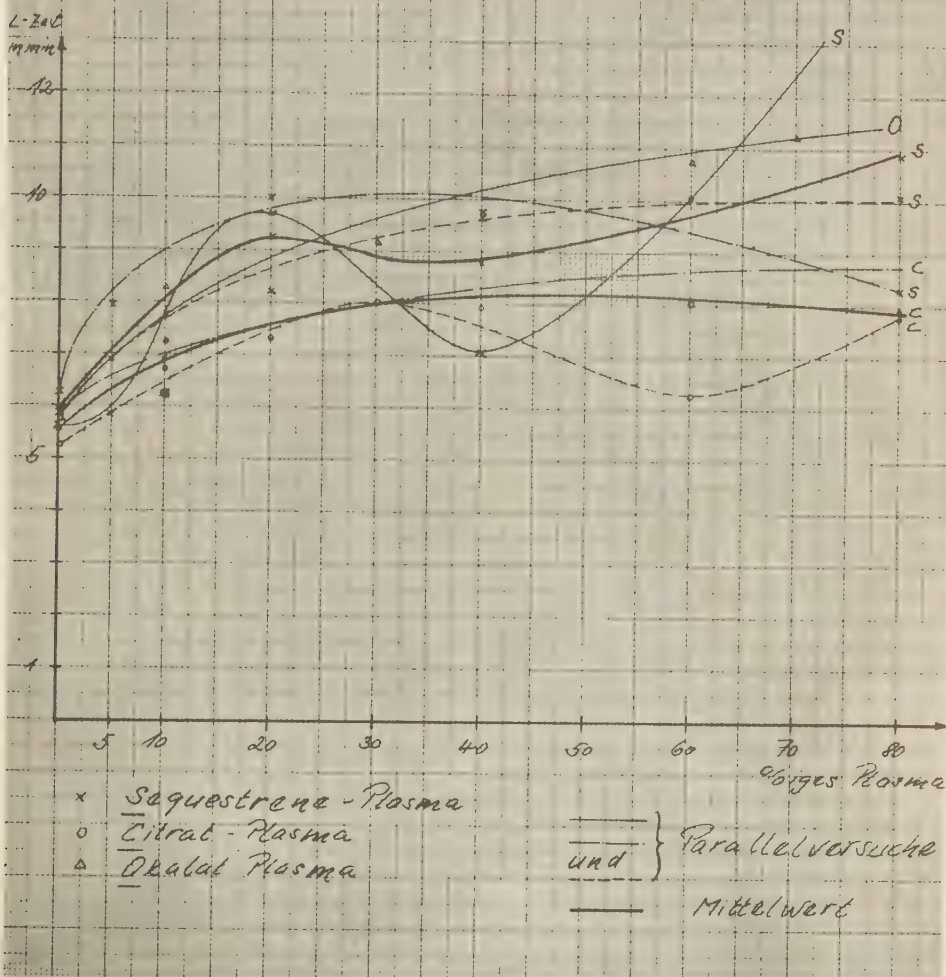
Es galt festzustellen, ob eine Hemmung bzw. Vermehrung der einzelnen Komponenten des Lysisinhibitors  $Ca^{++}$  - FSF die L-Zeit des Gerinnsels beeinflusst.

Durch Zusatz von Plasma wurde zunächst der FSF-Gehalt des Systems erhöht.

Die Wirkung des Plasmas auf die Lysiszeit:

| Ansatz + 0,5 ccm<br>n %ig Plasma |        | 0      | 5      | 10     | 20     | 30     | 40     | 60      | 70      | 80     |
|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|
|                                  | 5' 50" |        |        | 6' 15" | 8' 14" |        | 9' 45" |         |         | 10' 5" |
| 1) + 0,5 ccm                     | 6' 20" | 7' 54" |        |        | 10'    |        | 9' 38" |         |         | 8' 20" |
| Sequ. Plasma                     | 5' 40" | 5' 45" | 7' 38" | 9' 39" |        |        | 7' 5"  |         |         | 15' 5" |
| 2) + 0,5 ccm                     | 5' 50" |        | 7' 15" | 7' 20" |        |        | 7' 55" | 10' 5"  |         | 7' 55" |
| Cit. Plasma                      | 5' 15" |        | 6' 15" |        | 8'     |        |        | 6' 15"  |         | 7' 45" |
| 3) + 0,5 ccm                     |        |        |        |        |        |        |        |         |         |        |
| Oxalat Plasma                    | 5' 40" |        | 8' 20" |        |        | 9' 15" |        | 10' 45" | 11' 15" |        |

# Die Wirkung des Plasmazusatzes auf die Lysis-Zeit



### Ergebnis:

Zusatz von Plasma bis zu 10 Vol% der Fgen-Lösung verlängert die Lysiszeit; bei weiterer Plasma-Erhöhung bleibt die L-Zeit aber mehr oder weniger konstant hoch.

Da mit dem Plasma der Fgen-Gehalt des Systems sich erhöht, wurde im Anschluß daran mit Serum gearbeitet; wenngleich FSF im Gerinnsel gebunden wird, findet es sich doch auch im Serum (52).

Unsere Befürchtung, die innerhalb einer Versuchsreihe sich ändernden L-Zeiten könnten durch eine Inaktivierung des Th mittels Progressivantithrombin, d.h. durch eine Änderung der entstehenden Fibrinmenge bewirkt sein, wurde durch die Rest - N - Bestimmung der entstandenen Gerinnsel nicht bestätigt.

0,5 ccm Fgen + 0,05 ccm Sequ. + 0,35 ccm Th

|                  |       |       |      |
|------------------|-------|-------|------|
| ccm Serum (NaCl) | -     | 0,1   | 0,5  |
| Rest -N          | 0,554 | 0,574 | 0,60 |

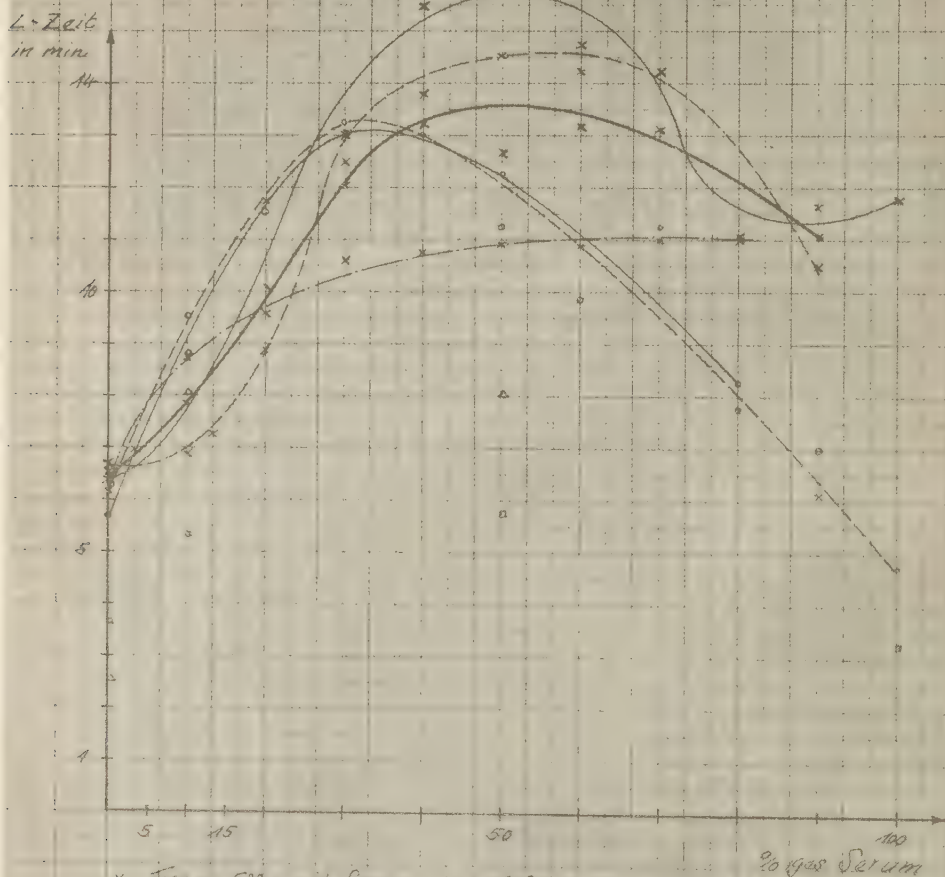
Die L-Zeit unter Zusatz von 0,5 ccm n%igem Serum: (s. Tabelle S. 26)

Ansatz: 1 ccm Fgen<sub>n</sub><sup>+) 0,5 ccm Serum + 0,1 ccm Sequ + 0,7 Th (30' - Gerinnung)</sup>

| n %lg Serum                                    | 0     | 5     | 10    | 15    | 20     | 30     | 40     | 50     | 60     | 70     | 80    | 90     | 100    |   |
|------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|---|
| Fgen 588                                       | 6'20" | 6'55" |       | 7'15" | 11'45" | 12'30" | 15'30" |        | 14'45" | 14'15" | 11'   | 11'40" | 11'45" | L |
| 20°C                                           | 6'10" |       | 8'45" |       | 9'35"  | 10'35" | 10'45" | 10'53" | 10'50" | 11'    | 11'5" | 6'5"   | 11'45" | Y |
|                                                | 6'40" |       | 6'55" |       | 8'55"  | 13'    | 13'45" | 14'30" | 14'15" | 14'20" |       | 10'30" |        | s |
| 0,5 ccm Ser                                    | 6'15" |       | 9'30" |       | 11'30" | 13'15" | 13'    | 11'15" | 9'50"  | 11'15" | 7'45" | 7'     | 4'45"  | s |
| +0,1 ccm                                       | 5'40" |       | 7'45" |       |        | 13'    |        | 12'15" |        |        | 8'20" |        |        | - |
| Trasylol                                       |       |       |       |       |        |        |        |        |        |        |       |        |        | Z |
| 37°C                                           |       |       |       |       |        |        |        |        |        |        |       |        |        | c |
| Ansätze mit halben Volumina: 0,5 ccm Fgen usw. |       |       |       |       |        |        |        |        |        |        |       |        |        |   |
| Fgen 640                                       | 3'40" |       | 5'20" |       |        |        |        | 5'50"  |        |        |       |        | 3'20"  | n |
| Fgen 643C                                      | 2'30" |       | 8'    |       |        |        |        | 8'     |        |        |       |        | 15'    |   |

+) Fgen<sub>n</sub>: n ≡ Charge

# Die Wirkung des Serumzusatzes auf die Lysis-Zeit



- x Expt 588 mit Serum bei 20°C
  - o Expt 588 mit Serum und Trasylol bei 37°C
  - Expt 640 mit Serum bei 37°C
  - Δ Expt 643C mit Serum bei 37°C
- } halbe Volumina

} Parallelversuche. — Mittelwert

## Ergebnis:

Weder die Wirkung des Plasmas noch des Serums zeigen den kontinuierlichen, proportional der Menge erwarteten Lysis-Zeit Anstieg.

Eindeutig ist nur, daß 10-25 Volum% Serum oder Plasma die Lysis hemmen. Blicke die Kurve von einem bestimmten Serum- oder Plasma-Zusatz an konstant hoch, so stimmt das Ergebnis mit den von Loewy und Edsall (49) gemachten Erfahrungen überein, daß bei konstantem  $\text{Ca}^{++}$  der Übergang von löslichem Fibrin ( $\text{F}_s$ ) in unlösliches ( $\text{F}_i$ ) nur über einen sehr kleinen Bereich einer Konzentrationsänderung des FSF sich erstreckt.

Die beschleunigte Lysis bei höheren Serumkonzentrationen dürfte plasminbedingt sein, da eine spürbare Hemmwirkung auf das Thrombin ausgeschlossen ist (s. S. 25).

Ein Zwischenversuch: Die Bestimmung der im Serum enthaltenen FSF-Menge auf Grund einer Änderung der L-Zeit: (s. S. 19)

Obwohl ein Erfolg kaum erwartet werden konnte, wurde doch versucht, mit  $\text{HgCl}$  (53) ein FSF-freies System zu schaffen und durch Zusatz von FSF-haltigen Sera die Lysis zu hemmen. Die Verlängerung der Lysiszeit wäre dann ein Maß für die mit dem betreffenden Serum zugesetzte FSF-Menge.

## Vorversuch:

| Leerversuch           | Ca-haltig                            | FSF-haltig                  | ohne FSF und $\text{Ca}^{++}$                           |
|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------|
| 1 ccm Fgen<br>(643 D) | →<br>0,1 ccm<br>$\text{HgCl}$ 0,1%ig | →<br>0,1 ccm Sequ.<br>1 %ig | →<br>0,1 ccm $\text{HgCl}$ 0,1%ig<br>0,1 ccm Sequ. 1%ig |
| 0,7 ccm Th            | →                                    | →                           | →                                                       |
| $\emptyset$           | 45'                                  | 25'                         | 12'                                                     |
| > 24 Std.             |                                      |                             |                                                         |

Die Ermittlung der notwendigen, jedoch nicht eiweißfällenden (Schwermetall!) Menge an  $\text{HgCl}$ :

| $\text{HgCl}$ /ccm Fgen: | 1000          | 750 | 500 | 250                             | 200 | 100 | 0 |
|--------------------------|---------------|-----|-----|---------------------------------|-----|-----|---|
| Wirkung:                 | Trübe Fällung |     |     | Klare, mit Th gerinnbare Lösung |     |     |   |

Ergebnis:

Dosen von  $\text{HgCl} = > 250 \text{ } \mu\text{g} / \text{ccm}$  Fgen wirken eiweißfällend,  
Mengen v.  $\text{HgCl} = < 200 \text{ } \mu\text{g} / \text{ccm}$  Fgen könnten verwendet werden.

Es soll nun die günstigste Zusammensetzung des Testansatzes gesucht werden.

Zu diesem Zweck wurden

- a) steigende Mengen  $\text{HgCl}$  (=FSF-freier Ansatz)
- b) steigende Mengen Sequestren (=  $\text{Ca}^{++}$ -freier Ansatz)
- c) steigende Mengen  $\text{HgCl}$  + Sequestren (= FSF- u.  $\text{Ca}^{++}$ -frei) verwendet.

Ansatz: 0,5 ccm Fgen (1%ig) + n ccm  $\text{HgCl}$  (0,1 %ig) bzw.  
n ccm Sequestren (1 %ig) + 0,35 ccm Th (1,5 E/ccm):  
45 min - Gerinnssel

| Vol % d. Zusatzes <sup>+) </sup>     |         | 0   | 5     | 10    | 15    | 20    |
|--------------------------------------|---------|-----|-------|-------|-------|-------|
| Zusatz: $\text{HgCl}$                | ccm     | 0,0 | 0,025 | 0,05  | 0,075 | 0,1   |
|                                      | %       | 0,0 | 25    | 50    | 75    | 100   |
| Nachgerinnung Nr. 638 <sup>++)</sup> |         | (+) | +     | +     |       | +     |
|                                      | Nr. 588 | (+) | +     | +     | +     | +     |
| L-Zeit                               | Nr. 638 | Ø   | 9'    | 8'    | 6'30" | 5'    |
|                                      | Nr. 588 | Ø   | 4'    | 3'25" | 3'    | 2'30" |
| A-dest Probe                         | Nr. 638 | -   | +     | +     | +     | (+)   |
|                                      | Nr. 588 | -   | +     | +     | (+)   | (+)   |
| Zusatz: Sequ                         | ccm     | 0,0 | 0,025 | 0,05  | 0,075 | 0,1   |
|                                      | %       | 0,0 | 250   | 500   | 750   | 1000  |
| Nachgerinnung Nr. 638                |         |     |       |       |       | ++    |
|                                      | Nr. 588 | +   | +     | +     | +     | +     |
| L-Zeit                               | Nr. 638 | Ø   | 4'    | 2'    | 2'30" | 2'25" |
|                                      | Nr. 588 | Ø   | 5'    | 5'    | 4'25" | 4'    |
| A-dest Probe                         | Nr. 638 | -   | (+)   | +     | +     | +     |
|                                      | Nr. 588 | -   | (+)   | (+)   | (+)   | (+)   |

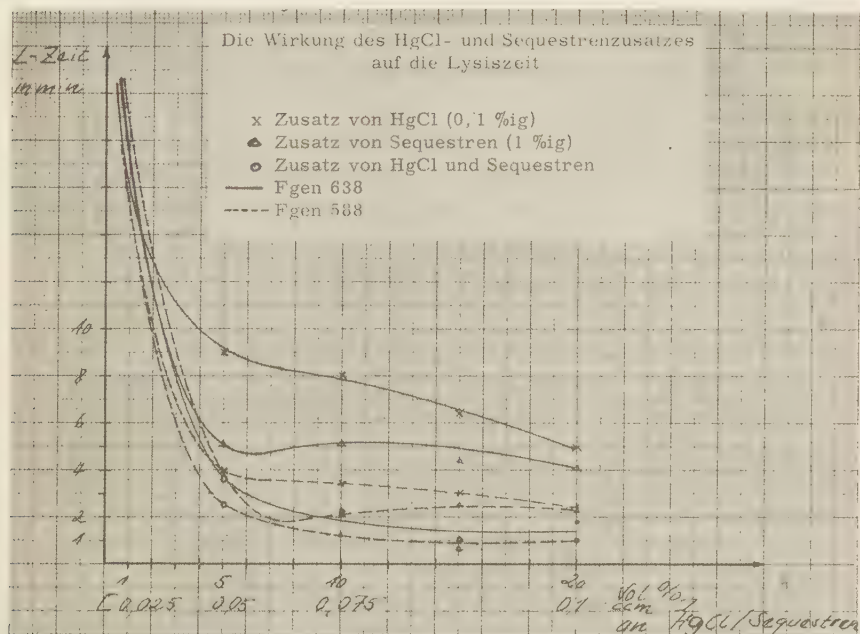
+) 0,5 ccm  $\equiv$  100 vol%

++) Chargen

Ansatz: 1 ccm Fgen + n ccm HgCl + n ccm Sequ. + 0,7 ccm Th  
(45' - Gerinnssel)

| Vol. % d. Zusatzes <sup>†)</sup> |         | 0   | 5     | 10    | 15    | 20    |
|----------------------------------|---------|-----|-------|-------|-------|-------|
| Zusatz: HgCl                     | ccm     | 0,0 | 0,025 | 0,05  | 0,075 | 0,1   |
| Sequ                             | ccm     | 0,0 | 0,025 | 0,05  | 0,075 | 0,1   |
| Nachgerinnung                    | Nr. 638 | +   | +     | +     | -     | -     |
|                                  | Nr. 588 | +   | +     | ++    | ++    | ++    |
| L-Zeit                           | Nr. 638 | 0   | 3'42" | 2'15" | 1'5"  | 1'55" |
|                                  | Nr. 588 | 0   | 1'45" | 1'15" | 40"   | 60"   |
| A-dest Probe                     | Nr. 638 | -   | +     | +     | (-)   | (-)   |
|                                  | Nr. 588 | -   | +     | (+)   | (+)   | (+)   |

†) 100 vol% = 1 ccm



# Ergebnis:

Es ist eindeutig, daß die Lysiszeit bei Zugabe von "tolerierbaren"  $\text{HgCl}$ -Dosen sich verkürzt. Das gleiche gilt für steigende Dosen von Sequestren - wenngleich nicht so offensichtlich. Gewinnt man nun ein Gerinnsel, welches sowohl  $\text{Ca}^{++}$  - als auch FSF-frei ist, so erhält man eine optimal rasche Lysis, wenn man den Ansatz folgendermaßen wählt:

1,000 ccm Fgen  
 0,075 "  $\text{HgCl}$  ( $\approx 75 \%$ )  
 0,075 " Sequ. ( $\approx 750 \%$ )  
 0,7 " Th ( $\approx 1 \text{ E}$ )

und 45 Minuten ausdreht.

Die Lysiszeit ist dabei abhängig von der verwendeten Fibrinogen-Charge. Es fiel auf, daß die Nachgerinnung bei den verschiedenen Chargen unterschiedlich ist, d.h. die gewonnene Fb-Menge ist für jede Charge spezifisch.

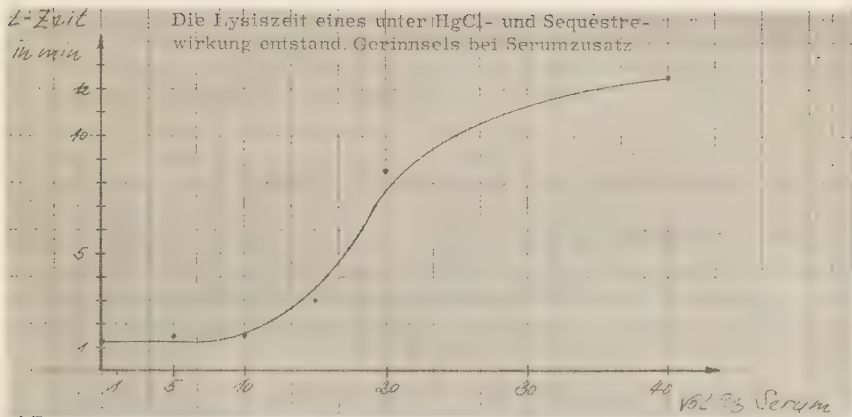
Ganz kurz wurden noch Probeversuche zur FSF-Bestimmung (49; 53) im Serum unternommen.

Die L-Zeit bei Zusatz von steigenden Mengen frischen Serums (M. W.)

Ansatz: 0,5 ccm Fgen + 0,075 ccm  $\text{HgCl}$  — Sequ. + n vol%<sup>+) Serum</sup>  
 (nach 15"!) + 0,35 ccm Th  $\longrightarrow$  45' - Gerinnsel

| vol % an Serum  | 0      | 5      | 10     | 15 | 20     | 40      |
|-----------------|--------|--------|--------|----|--------|---------|
| Nachgerinnung   | -      | ++     | ++     | +  | ++     | ++      |
| L-Zeit          | 1' 15" | 1' 30" | 1' 30" | 3' | 8' 30" | 12' 25" |
| A-dest. - Probe | +      | +      | +      | +  | +      | +       |

+) 0,5 ccm Fgen gelten als 100 vol%



### Ergebnis:

Die Ergebnisse sprechen dafür, daß sich auf der Basis der bisher geführten Untersuchungen eine quantitative Methode zur Bestimmung des FSG-Gehaltes von Blut ausarbeiten ließe. Da die zugesetzten Serumengen die Fgen-Konzentration nicht unter 440 mg/100 ccm drückten, kann der Verdünnungskoeffizient (22) vernachlässigt werden<sup>+</sup>).

Man könnte in Testampullen 0,5 ccm Fgenlösung + 0,075 ccm HgCl<sub>2</sub> (0,1 %ig) und Sequestren (1 %ig) gefriertrocknen und kurz vor dem Gebrauch lösen, Serum und nach 15 Sekunden Thrombin zugeben und die L-Zeit des entstandenen Gerinnsels messen. - Es müßte jeweils ein Leerwert mitlaufen. Auch die entstehenden Fb-Mengen müßten festgestellt werden.

### 2. Die Lysiszeit bei Zusatz von B<sub>6</sub> (Merck) = 2-Methyl-3 - oxy - 4,5 - dioxymethylpyridin (48).

Es wurde untersucht, ob Vitamin B<sub>6</sub> die L-Zeit beeinflußt, da es mit seinen bekannten chemischen Wirkungen (Transaminierung, Decarboxylierung von A. S., Desaminierung und Abspaltung von H<sub>2</sub>O bzw. H<sub>2</sub>S aus Serin oder Cystin) sehr wohl in die Struktur des entstehenden Gerinnsels eingreifen konnte.

<sup>+</sup>) Nach Freimann und Clifton (22) treten "Lysiszeit stürze" (durch Plasminwirkung) erst in einem Konzentrationsbereich von 425-225 mg Fgen/100 ccm auf.

Da bereits vor der Thrombinzugabe durch 0,5 ccm der B<sub>6</sub>-Lösung verschiedener Konzentration eine Trübung des Fgens auftrat <sup>++</sup>), wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt:

a) mit Thrombin

Normal-Ansatz +

|         |                     |       |         |         |     |       |
|---------|---------------------|-------|---------|---------|-----|-------|
| 0,5 ccm | ccm B <sub>6</sub>  | 0     | 0,1     | 0,2     | 0,3 | 0,4   |
|         | ccm NaCl<br>(phys.) | 0,5   | 0,4     | 0,3     | 0,2 | 0,1   |
| L-Zeit  |                     | 7'15" | 24 Std. | 24 Std. | 22' | 8'30" |

b) ohne Thrombin, nur mit B<sub>6</sub>

Ansatz: 1 ccm Fibrinogen + 0,1 ccm Sequ. +

|                   |          |     |         |         |        |      |      |
|-------------------|----------|-----|---------|---------|--------|------|------|
| 0,5 ccm           | ccm      | 0   | 0,05    | 0,15    | 0,25   | 0,35 | 0,45 |
|                   | ccm NaCl | 0,5 | 0,04    | 0,35    | 0,25   | 0,15 | 0,05 |
| Gerinnungsbildung |          | -   | -       | -       | +      | +    | -    |
| L-Zeit            |          | -   | 24 Std. | 24 Std. | 20'30" | 17'  | -    |

Diese "fibrinoplastische" Wirkung von B<sub>6</sub> läßt sich vielleicht mit seiner Transaminasewirkung auf die endständige Glutaminsäure erklären (48).

Die Unlöslichkeit der unter Wirkung von 5-20 vol%igem B<sub>6</sub> entstandenen Gerinnung ist unverständlich. (Denaturierung?). Die Versuchsreihe wurde abgebrochen, da kein unmittelbarer Nutzen ersichtlich war.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Löslichkeit des Fibrins in Harnstoff direkt abhängig ist von der Temperatur, von der Angriffsfläche des Fibringerinnsels für den Harnstoff und von der mehr oder weniger großen Verunreinigung bzw. Beimischung von Substanzen während des Gerinnungsvorganges.

++) Auch bei Zusatz von 1 ccm 0,001 %igem Heparinoid 31150 zu 1 ccm 1 %iger Fgenlösung kam es zur Ausbildung eines weißen Niederschlages, der sich innerhalb 10 sek (!) in 1 ccm m 4,5 Harnstoff löste.

Als Standardbedingung für die Versuche soll gelten:

Zur Herstellung von Solufibrin (harnstoffgelöstes Fibrin) wird ein  $\text{Ca}^{++}$ -frei entstandenes Gerinnsel aus Fibrinogen vom Rind unter Bewegung in 4, 5 m Harnstoff bei Zimmertemperatur zur Lysis gebracht.

## Fibrin als Repolymerisat

Eine wichtige Eigenschaft unseres Fibrin-Lysats ist seine Repolymerisierbarkeit.

Die Wiedervereinigung der durch den Harnstoff getrennten Fb-Monomeren läuft ähnlich rasch ab wie die Polymerisation des aktivierten Fibrinogens, sobald die Harnstoffkonzentration durch Dialyse oder Verdünnung herabgesetzt wird (51; 57; 71; 78).

Warum es zur Resynthese kommt - auch bei wiederholter Auflösung - diese Frage ist nicht entschieden.

Seegers und Landaburu (44) sind der Überzeugung, Thrombin als Polymerase sei dafür verantwortlich, während Laki und Lorand (42; 43; 51), Scheraga und Laskowsky (65), Latallo et al. (47) die Meinung vertreten, daß das Thrombin durch den Harnstoff zerstört ist und die Polymerisation auf einer durch das Th. bewirkten bleibenden Veränderung des Fgen-Moleküls beruht, die immer dann zur Gerinnung führt, "wenn das Milieu geeignet ist." (51)

Um der Lösung dieses Problems näher zu kommen, wurde die Repolymerisation unter verschiedenen Bedingungen untersucht, zumal ein Ausbleiben der Resynthese in vivo von Bedeutung wäre.

Zunächst wurde das unter Th. -Wirkung entstandene  $\text{Ca}^{++}$ -freie Fibrin immer wieder aufgelöst und ausgefällt. Bis zu 6 mal wurde diese Umfällung gesteigert.

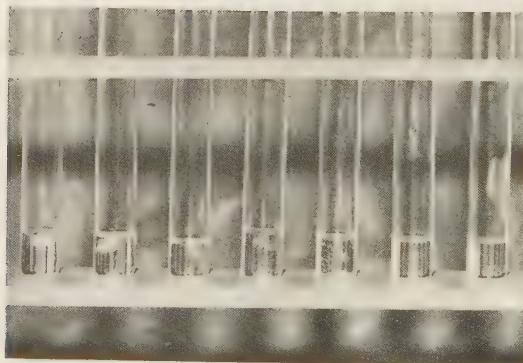
Die Beobachtung, daß harnstoffgelöstes Fibrin, das wenig, wenn überhaupt wirksames Th enthält (s. S. 38), immer wieder gerinnt, spricht gegen die Notwendigkeit der Polymerase Thrombin.

Beispiel einer Umfällung: (s. S. 35)

Beispiel einer Umfällung:

3 ccm Fgen + 0,3 ccm Sequ. + 2,1 ccm Fh 45 min

|                      |      |                                                         |   |                |
|----------------------|------|---------------------------------------------------------|---|----------------|
| Lysis <sub>1</sub>   | in   | 6 ccm Harnstoff + 0,6 Puffer 7,6                        | → | S <sub>1</sub> |
| Reprod. <sub>1</sub> | 5"   | 5 x 1 ccm S <sub>1</sub> in 5 x 10 ccm H <sub>2</sub> O |   |                |
| Lysis <sub>2</sub>   | 60'  | 5 Fb-F2 in 5 ccm Harnstoff (pH 7,6)                     | → | S <sub>2</sub> |
| Reprod. <sub>2</sub> | 8"   | 4 x 1 ccm S <sub>2</sub> in 4 x 10 ccm H <sub>2</sub> O |   |                |
| Lysis <sub>3</sub>   | 60'  | 4 Fb-F1 in 4 ccm Harnstoff (pH 7,6)                     | → | S <sub>3</sub> |
| Reprod. <sub>3</sub> | 9"   | 3 x 1 ccm S <sub>3</sub> in 3 x 10 ccm H <sub>2</sub> O |   |                |
| Lysis <sub>4</sub>   | 55'  | 3 Fb-F1 in 3 ccm Harnst. (pH 7,6)                       | → | S <sub>4</sub> |
| Reprod. <sub>4</sub> | 8"   | 2 x 1 ccm S <sub>4</sub> in 2 x 10 ccm H <sub>2</sub> O |   |                |
| Lysis <sub>5</sub>   | 120' | 2 Fb-Fi in 2 ccm Harnst. (pH 7,6)                       | → | S <sub>5</sub> |
| Reprod. <sub>5</sub> | tr.  | ganz kleine Fb-Fasern                                   |   |                |



Die immer kleiner werdenden Gerinnse<sup>1+)</sup> ließen die Hoffnung aufkommen, daß mit der Umfällung ein Weg gefunden sei, eingeschlossene Proteine zu eliminieren. Dies sollte mit der U. Z. untersucht werden.

Dazu musste der Proteingehalt möglichst zwischen 1 und 0,5 % liegen, weshalb die zur Lysis verwendeten Harnstoffmengen von Mal zu Mal reduziert wurden, so daß die Flocken ungefähr gleich groß blieben.

Es erwies sich dabei als günstig, auch wenn die Resynthese sogleich nach Verdünnung eintrat, die Flocke noch etwas stehen zu lassen; sie bzw. die Fäden ließen sich dann besser auf das Stäbchen aufdrehen.

Diese "allmähliche Resynthese" täuschte ein Ausbleiben derselben vor, wenn bei Verdünnung mit etwas lipaemischem Plasma das Gefäß dauernd in Bewegung gehalten wurde. Die entstandenen Fb-Flocken waren so klein, daß sie nur im Mikroskop nachgewiesen werden konnten (s. S. 67).

Reproduktionszwischenfälle, d. h. schlechte Ausfällung oder Unspinnbarkeit der entstandenen Gerinnse oder auch mangelhafte Auflösung im Harnstoff, haben uns, da direkte Gründe nicht ersichtlich waren, oft Kummer gemacht.

Wir glauben rückschauend sagen zu können, daß ersteres vor allem dann der Fall war, wenn in den heißen Sommertagen fermentfibrinolytische Vorgänge abliefen. Wir waren dann gezwungen, nachts, evtl. in gekühltem Wasserbad, zu arbeiten. Die schwere Löslichkeit war wahrscheinlich auf eine nachträgliche Verunreinigung mit  $\text{Ca}^{++}$  zurückzuführen, wie sie, wenn auch in geringen Mengen, in den hitzegetrockneten Gläsern oder auch in Aqua dest. bzw. am Filterpapier vorkommen. Wir verwendeten dann Aqua bidest. "entmineralisiert", spülten die Gläser nochmals mit Aqua dest. vor und kochten die gelackten Stäbchen in Sequestren-Lösung.

Eindeutig waren auch Unterschiede zwischen den einzelnen Fibrinogen-Chargen. Diese konnten von uns leider nicht spezifisch beeinflußt werden.

Herstellung der Lösungen für die Ultra-Zentrifuge:

60 Min Gerinnse aus:

|                                                                            |                               |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 10 ccm Fgen + 1 ccm Sequ. + 7 ccm Th in 20 ccm Harnstoff Solu <sub>1</sub> |                               |
| 15 Fl <sub>S1</sub>                                                        | " 12,5 ccm "                  |
| 10 Fl <sub>S2</sub>                                                        | " 7,5 ccm "                   |
| 6 Fl <sub>S3</sub>                                                         | " 5,0 ccm "                   |
| 5 Fl <sub>S4</sub>                                                         | " 4,0 ccm " Solu <sub>5</sub> |

Die Lösungen standen über Nacht bei 4° C.

<sup>1+)</sup> Es soll vermerkt werden, daß die Glasadhaerens (und damit der Substanzverlust) der Fb-Flocken von Umfällung zu Umfällung zunahm.

Ergebnis der U. Z. -Untersuchungen (s. S. 21); sie wurden freundlicherweise im Labor von H. Priv. Doz. Dr. M. Knedel durchgeführt.

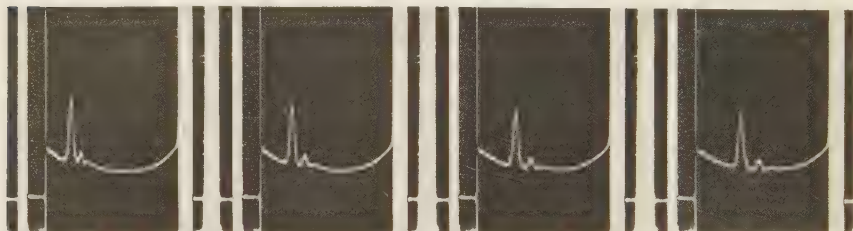
$S_1$  : 3 Komponenten

- a)  $S_{20} = 6,72$  (76,4 %)
- b)  $S_{20} = 9,39$  (15,9 %)
- c)  $S_{20} = 11,12$  (7,7 %)

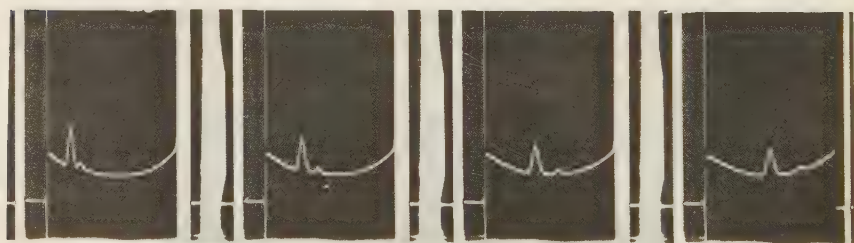
$S_5$  : 3 Komponenten

- a)  $S_{20} = 6,91$  (76,9 %)
- b)  $S_{20} = 9,80$  (17,9 %)
- c)  $S_{20} = 12,39$  (5,2 %)

Solufibrin<sub>1</sub>



Solufibrin<sub>5</sub>



Alle Komponenten ( $\gamma$ -Globuline) könnten Fibrinmonomeren, -Dimeren oder Bruchstücke derselben sein. Von einer "Reinigung" kann eigentlich nicht die Rede sein.

Allerdings war hierbei - der erhöhten Haltbarkeit wegen - der Harnstoff mit Diäthylbarbitursäure (pH 7,6) gepuffert worden, was der Elimination von Fremdproteinen entgegensteht (61).

Die sechsmalige Umfällung wurde für die meisten Injektionspräparate beibehalten, da bei dem später verwendeten pH 6 eine Reinigung von Th und sonstigen ungerinnbaren Proteinen wahrscheinlich doch erhöht wurde (61).

Daß die Flocke aus Solu<sub>1</sub> tatsächlich noch etwas Thrombin - vielleicht in der eingeschlossenen Flüssigkeit - enthielt, zeigt ein einfacher Versuch:

#### Th-Aktivität des Fb-Gerinnsels:

| 0,5 ccm Fgen +<br>(prothrombinfrei) | Fl aus<br>0,25 ccm S <sub>1</sub> | (gekocht)<br>→ | Fl aus<br>0,25 ccm S <sub>5</sub> | (gek.)<br>→ | Ø |         |
|-------------------------------------|-----------------------------------|----------------|-----------------------------------|-------------|---|---------|
| Gerinnung                           | -                                 | -              | -                                 | -           | - | 15'     |
|                                     | -                                 | -              | -                                 | -           | - | 60'     |
|                                     | -                                 | -              | -                                 | -           | - | 120'    |
|                                     | +                                 | -              | (+)                               | -           | - | 24 Std. |

Da Thrombin fester als jedes andere Protein am Fb-Gerinnsel festgehalten (adsorbiert) wird, ist die fehlende Gerinnung des Fibrinogens am Gerinnsel aus Solu<sub>5</sub><sup>(+)</sup> ein Zeichen dafür, daß dieses Solu<sub>5</sub> auch von anderen Proteinen frei sein dürfte (Morrison nach 46)

Um die Konzentration des Fibrins möglichst konstant zu halten, wurde jeweils so gearbeitet, daß aus n ccm Fgen-Lösung auch n ccm S<sub>6</sub> entstanden.

Daß dies möglich war, zeigen die durch Multiplikation des nach Kjeldahl (8; 19) ermittelten Rest-N mit dem Umrechnungsfaktor<sup>+) 5,8 (nach Wöhlich) erhaltenen Werte:</sup>

#### 1) Charge 628

|                                         |                 |
|-----------------------------------------|-----------------|
| Fb aus 1 cm <sup>3</sup> S <sub>1</sub> | <u>4,988</u> mg |
| Fb " " S <sub>6</sub>                   | <u>4,756</u> mg |

#### 2) Charge 638

|                             |                  |
|-----------------------------|------------------|
| Fb aus 1 ccm S <sub>1</sub> | <u>4,1064</u> mg |
| Fb " " S <sub>3</sub>       | 3,248 mg         |
| Fb " " S <sub>6</sub>       | <u>4,176</u> mg  |

### Die Abhängigkeit und Beeinflussbarkeit der Repolymerisation

Als sichere "Ursache" oder besser auslösendes Moment der Resynthese hat sich das oben beschriebene Umfällungsmanöver, d.h. die Herabsetzung der Harnstoffkonzentration durch Verdünnen mit H<sub>2</sub>O, erwiesen.

An Hand einer Verdünnungsreihe wurde die Repolymerisationsgeschwindigkeit gemessen.

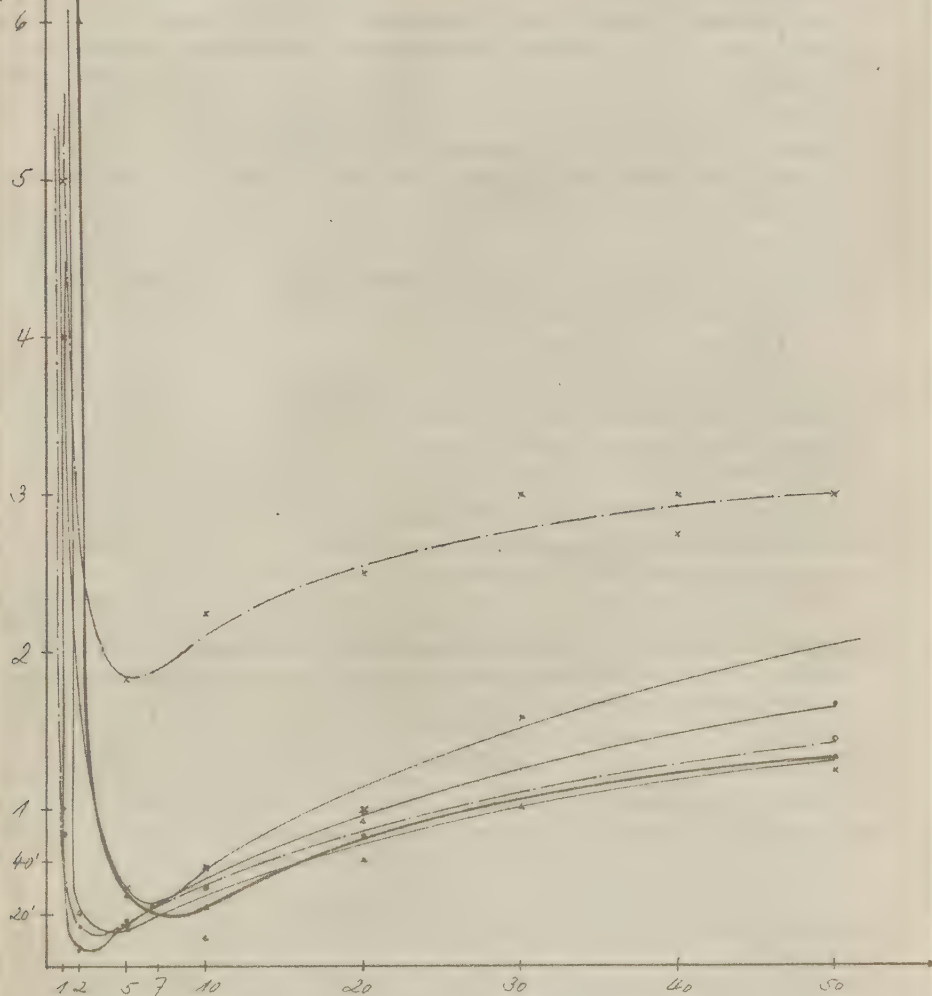
<sup>+) Von Brand, Kassel u. Saidel (nach 19) wird der Faktor 5,92, von von Schwick (67b) 6,25 angegeben.</sup>

Die RP-Zeit in Abhängigkeit vom Verdünnungsgrad

| Solu: H <sub>2</sub> O    | 1:0,5 | 1:1  | 1:2 | 1:5   | 1:7 | 1:10  | 1:20  | 1:30  | 1:40  | 1:50  |
|---------------------------|-------|------|-----|-------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|
| Solu <sub>1</sub> (588)   |       | 1'9" |     |       |     | 1'32" | 2'29" |       |       |       |
|                           |       | 1'7" |     |       |     | 1'59" | 2'6"  |       |       |       |
|                           |       | 1'5" |     |       |     | 1'59" | 2'9"  |       |       |       |
| 20° C                     |       | 5'   |     | 1'50" |     | 2'15" | 2'30" | 3'    | 2'45" | 3'    |
| 37° C                     |       | 4'   |     | 30"   |     | 37"   | 1'    | 1'35" | 3'    | 1'15" |
| Solu <sub>1</sub> (640)   |       | 60"  | 15" | 17"   |     | 30"   | 49"   |       |       | 86"   |
| 20° C                     |       | 60"  | 6"  | 16,5" |     | 30"   | 60"   |       |       | 100"  |
| Solu <sub>1</sub> (643 C) |       | 12'  | 20" | 15"   | 24" | 11"   | 40"   | 60,5" |       | 79"   |
| 37° C                     |       |      |     |       |     |       |       |       |       |       |
| Solu: Plasma              | Ø     | 30'  | 6'  | 27"   | 22" | 21,5" | 55"   | 60"   |       | 80"   |

RP-Zeit  
in min

# Die Abhängigkeit der RP-Zeit vom Verdünnungsgrad



x Fgen 588

o Fgen 640

Δ Fgen 643C

} verdünnt mit Wasser

Verdünnungsgrad 1. n

— bei 20°C

— bei 37°C

— Fgen 643C verdünnt mit Citratplasma bei 37°C

Der Verlauf der Kurven spricht sehr für eine "reine" Polymerisation von aktivierten Monomeren.

Die langsame Polymerisation bei minimaler Verdünnung (1:1) ist durch die relativ hohe Harnstoff-Konzentration bedingt. Ist aber die Konzentration des Lösungsmittels einmal genügend herabgesetzt (1:5 - 1:10), so stürzen sich die Monomeren aufeinander. Bei noch größerer Verdünnung (1:20 - 50) sind die einzelnen Teilstücke sehr weit auseinander und können sich erst nach einem mehr oder weniger langen Aufeinanderzueilen verbinden <sup>+)</sup> . Die Repolymerisationsgeschwindigkeit ist vor allem auch für die Versuche in vivo von Bedeutung.

Zur Untersuchung der Repolymerisation soll die Verdünnung 1:10 als sog. Aqua dest. -Probe verwendet werden.

Als wichtiger Faktor für das Ingangkommen der Resynthese stellte sich das Alter <sup>++)</sup> des Solufibrins, also die Zeit vom Harnstoff-Zusatz bis zu dessen Entfernung heraus. Dabei muß gleichzeitig die Aufbewahrungstemperatur mitberücksichtigt werden.

Bei - 18° (Tiefkühltruhe)

war die Repolymerisation nach 5 Monaten noch möglich, wenngleich die "Schönheit" der Flocke gelitten hatte; sie war brüchig.

Bei + 4° (Kühlschrank)

schwankte die gute Repolymerisierbarkeit zwischen 4 und 12 Tagen. Eine Trübung mit verzögerter Ausflockung unter Schütteln konnte hier auch nach 6 Monaten noch erzielt werden. Nach 8 Monaten war keine Resynthese, auch keine Trübung mehr erkennbar.

Im Zimmer, also zwischen 16 und 26°,

gehaltenes Solu war nach 24 Stunden noch gut zu resynthetisieren. Negativ - mit minimaler Trübung - war die Aqua dest. -Probe nach 4 Tagen.

Bei einer Temperatur von 37° (Brutschrank) genügte schon die Lysiszeit von 1-2 Stunden, um die Repolymerisation negativ zu beeinflussen.

Bei möglicher Resynthese war die Temperatur der Verdünnungsflüssigkeit nur von geringem Einfluß auf die RP-Zeit (s. S. 39).

---

+) Vergleiche Latallo et al (41): "The polymerisation is greatly influenced by the monomere-concentration. "

++) Es soll hier vermerkt werden, daß Solufibrin, das unter Beimischung von Serum, Plasma, Gelatine oder Puffer (pH 7,6) entstanden war, eine längere Haltbarkeit zeigte.

Daß bei fehlender Repolymerisation die Fibrin-Monomeren abgebaut sind und nicht etwa nur Th inaktiv ist, beweist folgender Versuch:

| Ansatz                    | A. dest. -Probe |
|---------------------------|-----------------|
| "Solu" + H <sub>2</sub> O | -               |
| " + " + Th                | -               |
| " + " + Fgen              | tr.             |
| " + " + Fgen + Th         | +               |

Erst Fgen und Th gemeinsam führten zur Bildung eines Gerinnsels, Inaktivatoren der Polymerisation waren nicht entstanden. Es dürfte sich um einen fermentativen Abbau (Verunreinigung der Substanzen mit Thrombin E, C und Plasmin (65)) gehandelt haben, der bei höheren Temperaturen beschleunigt abläuft.

Die verhältnismäßig lange Haltbarkeit des Solufibrins spricht in etwa auch gegen eine Thrombinabhängigkeit der Resynthese, da das Enzym während der langen Zeit vermutlich zerstört worden wäre (44; 51). Wenn das Fibrin ein Substrat für das Th ist (44), könnte es zwar als Schutzsubstanz fungieren; es müßte dazu aber nach Seegers (44) vorher schon im Harnstoff gewesen sein.

#### pH-Wert und Resynthese:

Die Repolymerisation zeigt auch eine starke Abhängigkeit vom pH der Verdünnungsflüssigkeit, (s.unten)

Es fiel uns zunächst auf, daß ein längeres Durchblasen von Ausatemungsluft (CO<sub>2</sub>!) die Resynthese hemmt.

Verdünnung 1:10 mit

| reinem A. dest.           | pH   | Resynthese |
|---------------------------|------|------------|
| " + Essigsäure            | 3,8  | -          |
| " + "                     | 4,2  | -          |
| " + "                     | 4,8  | -          |
| " + "                     | 5,2  | -          |
| " + "                     | 6,0  | (+)        |
| " + Diäthylbarbit. Puffer | 6,7  | (+)        |
| " + " "                   | 7,6  | +          |
| " + NaOH                  | 8,0  | -          |
| " + "                     | 9,0  | -          |
| " + "                     | 10,0 | -          |

Die scharfe Begrenzung des pH für einen positiven Ausfall der Aqua dest. - Probe spräche für eine Ferment- ( Th ?) Abhängigkeit der Reaktion, es sei denn, daß auch hier fehlt, was Laki (41) für die Polymerisation fordert: Das passende Milieu; denn nach Shulman (70) kommt es bei höherem pH zur elektrischen Abstoßung zweier Fibrin-Monomeren, während bei niedrigerem pH sich Protonen störend mit der Imidazolgruppe des Histidins verbinden.

### Repolymerisation und Antikoagulantien:

Wegen der fraglichen Notwendigkeit des Th wurde zunächst der Einfluß der Antikoagulantien untersucht.

Test-Ansatz: (2,5-n) ccm A. dest.  
                   n ccm Test-Substanz  
                   0,25 ccm Solu Fibrin  
                   (NB 2,5 ccm · 100 vol%)

Vorversuch mit

1.) Thrombocid (250 mg/ccm)

|                       | 0,5   | 1    | 2    | 5     | 10   | 20  | 30    | vol%        |
|-----------------------|-------|------|------|-------|------|-----|-------|-------------|
|                       | 3.125 | 6,25 | 12,5 | 31,25 | 62,5 | 125 | 187,5 | mg/ccm Solu |
| Gerinnsel-<br>bildung | -     | -    | -    | -     | -    | -   | -     |             |

Da in allen Fällen nach 45 Min. keine ordentliche Flocke, sondern nur Fb-Fäserchen entstanden, wurde der Versuch eingestellt. Die verwendeten Mengen erwiesen sich als Hemmer der Resynthese; sie waren ja auch sehr hoch.

2.) ♂-Heparin (250 mg/ccm)

| mg/ccm Solu       | 0,2 | 0,4   | 0,8   | 2     | 4  | 8  | 10    |
|-------------------|-----|-------|-------|-------|----|----|-------|
| nur kl. Fb-Fasern | 5'  | 2'47" | 4'40" | 3'30" | 5' | 5' | 3'10" |

Auch ♂-Heparin ließ in Dosen von 0,2 - 10 mg/ccm Solu<sub>1</sub> keine ordentliche Resynthese mehr zu. Heparin vermag in höheren Dosen mit vielen Proteinen zu reagieren.

- 3.) Heparinoid G 31 150 (10 %ig = 100 mg/ccm)  
Verdünnung: 1:10 mit phys. NaCl (= 10 mg/ccm)

|                     |             |                   |     |   |   |                  |    |    |    |
|---------------------|-------------|-------------------|-----|---|---|------------------|----|----|----|
| vol% <sup>+) </sup> | mg/ccm Solu | 0                 | 0,5 | 1 | 2 | 5                | 10 | 20 | 50 |
| R-P-Zeit            | 1' 50"      | nur kl. Fb-Fasern |     |   |   | keine Fb-Bildung |    |    |    |

Auch Heparinoid G 31 150 hemmt in Mengen von 0,5 - 50 mg/ccm Solu die Resynthese.

Diese Vorversuche gaben zum Ansetzen von weiteren Verdünnungsreihen Anlaß.

- a) Heparinoid 0,1 %ig 1 mg/ccm

|             |        |        |           |           |                            |    |    |    |
|-------------|--------|--------|-----------|-----------|----------------------------|----|----|----|
| vol%        | 0      | 0,5    | 1         | 2         | 5                          | 10 | 20 | 50 |
| mg/ccm Solu | 0      | 0,05   | 0,1       | 0,2       | 0,5                        | 1  | 2  | 5  |
| RP-Zeit     | 1' 50" | 4' tr. | 4' 15" tr | 4' 25" tr | keine Fibrinflockenbildung |    |    |    |

Das Heparinoid scheint tatsächlich geeignet, eine Dosis-Abhängigkeit der Resynthese-Zeit zu untersuchen.

- b) Heparinoid 0,01 %ig 100  $\gamma$ /ccm

|                    |        |                                                       |    |    |    |     |     |     |
|--------------------|--------|-------------------------------------------------------|----|----|----|-----|-----|-----|
| vol%               | 0      | 0,5                                                   | 1  | 2  | 5  | 10  | 20  | 50  |
| $\gamma$ /ccm Solu | 0      | 5                                                     | 10 | 20 | 50 | 100 | 200 | 500 |
| RP-Zeit            | 1' 25" | Bildung von Fibrinfasern abnehmender Dichte und Zahl. |    |    |    |     |     |     |

Nach 10 Min. wurde Fgen zugesetzt; es geschah nichts. Daß auch die Zugabe von Th nach weiteren 5 Min. keine Fibrinflocke entstehen ließ, deutet sehr auf eine fibrinolytische Wirkung des Heparinoid hin. Da bei den niedrigen Heparinoid-Dosen (5 - 100  $\gamma$ /ccm) die Faserbildung deutlich stärker war, wurde das Hep. weiter verdünnt.

- c) Heparinoid 0,001 %ig 1  $\gamma$ /ccm

|                                   |               |        |        |        |     |    |              |    |
|-----------------------------------|---------------|--------|--------|--------|-----|----|--------------|----|
| vol%                              | 0             | 0,5    | 1      | 2      | 5   | 10 | 20           | 50 |
| $\gamma$ /ccm Solu <sup>+) </sup> | 0             | 0,05   | 0,1    | 0,2    | 0,5 | 1  | 2            | 5  |
| RP-Zeit                           | 1' 20"/1' 15" | 1' 30" | 1' 37" | 2' 50" | 2'  | 3' | Fb-Fasern 4' |    |

Dieses Ergebnis, welches eine gewisse Abhängigkeit von der Heparinoid-Konzentration zeigt, hat uns sehr ermutigt; wir setzten eine letzte Verdünnungsreihe an:

d) Heparinoid 0,00001 %ig 0,1  $\gamma$ /ccm

|               |               |       |       |      |       |      |     |       |
|---------------|---------------|-------|-------|------|-------|------|-----|-------|
| vol%          | 0             | 0,5   | 1     | 2    | 5     | 10   | 20  | 50    |
| $\gamma$ /ccm | 0             | 0,005 | 0,01  | 0,02 | 0,05  | 0,1  | 0,2 | 0,5   |
| Solu          |               |       |       |      |       |      |     |       |
| RP-Zeit       | 1'37" / 1'40" | 1'45" | 1'40" | 2'   | 2'20" | 2'30 | 3'  | 3'25" |

++) Die durchwegs etwas verlängerten RP-Zeiten dürften daher rühren, daß das Solu für diese Versuche längere Zeit bei Zi. T. stand.

### Zusammenfassung

Heparinoid (G 31150 oder Thrombocid) und  $\alpha$ -Heparin stören unter den angewandten Versuchsbedingungen die Resynthese im Sinne einer Verzögerung oder Blockade - abhängig von der verwendeten Dosis.

Ob dies auf einer Veränderung des Thrombins oder der Fibrinmonomeren beruht, kann, da diese Substanzen besonders in höheren Dosen mit vielen Proteinen im Sinne veränderter Ausflockung (R. Marx) zu reagieren vermögen, nicht entschieden werden.

Versuche mit Eleparon und Chondroitinschwefelsäure zeigten, daß beide Substanzen die Resynthese von Solufibrin stören; dabei erwies sich Eleparon als ein wirksamerer Hemmer als das chemisch verwandte Chondroitinsulfat. Da keine Proportionalität zwischen zugesetzter Menge des Hemmstoffes und resultierender Hemmwirkung ersichtlich war, wird auf die Wiedergabe der Versuchsreihen verzichtet.

### Repolymerisation und hochpolymere Substanzen

Im Gegensatz zum Heparinoid sollte nun noch die Wirkung einer hochpolymeren Substanz der Gelatine Merck (10%) untersucht werden.

Da bei Zusatz von einem Tropfen Gelatine zum Verdünnungswasser sofortige Gerinnung des zugegebenen Solus eintrat, wurde gleich mit wässrigen Gelatinelösungen gearbeitet. (Tabelle s. S. 46)

+) vol% an Heparinoid von H<sub>2</sub>O (2,5 ccm = 100 vol% mg/ccm Solu:  
mg ( ) Heparinoid pro 1 ccm Solu

RP-Zeit  
in min

Die Abhängigkeit der RP-Zeit vom Heparin-Gehalt,  
der Verdünnungs-faktor



Die Repolymerisationsgeschwindigkeit unter Wirkung von Gelatine-Lösung

| Gelatine Konz. | vol%    | 0     | 0,5 | 1   | 2   | 5   | 10  | 20  | 50  | 100 |
|----------------|---------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 %ig          | RP-Zeit | 1'15" |     | 55" |     | 55" |     | 45" |     | 5"  |
| 0,001 %ig      | RP-Zeit | 1'15" | 40" | 35" | 37" | 35" | 35" | 36" | 28" |     |
| 0,0001 %ig     | RP-Zeit | 1'20" | 43" | 43" | 33" | 40" | 40" | 50" | 37" | 34" |

### Ergebnis:

Eine Beschleunigung der Repolymerisation ist eindeutig; eine Proportionalität zwischen zugesetzter Gelatinemenge und RP-Zeit ist jedoch nicht ersichtlich.

Interessant war auch die Tatsache, daß die Lysis eines "Gelatine-Repolymerisats" mehr als doppelt soviel Zeit beansprucht als die eines "reinen" Repolymerisats. Dafür war aber auch die Resynthesefähigkeit (s. S. 41), d. h. die Haltbarkeit des "Gelatine-Solus" bedeutend höher (s. unten).

Eine kurze Gegenüberstellung von Leer-, Heparinoid- und Gelatineversuch ist vielleicht ganz anschaulich.

|                              | Leerversuch   | Heparinoidzusatz | Gelatinezusatz  |
|------------------------------|---------------|------------------|-----------------|
| Aqua dest.                   | 2,5 ccm       | 2,45 ccm         | 2,45 ccm        |
| Substanz n                   | -             | 0,05 " 0,0001 %  | 0,05 " 0,0001 % |
| Solu <sub>5</sub> (n-haltig) | 0,25 ccm/rein | 0,25 " (Hep.)    | 0,25 " (gelat.) |
| RP-Zeit                      | 1' 20"        | 2' 50"           | 33"             |

Die Ansätze (L-, H-, G-Fb<sup>†</sup>)-Flocken in H<sub>2</sub>O!) blieben bei Zi. T. stehen.

Beschaffenheit der Flocke nach n-Tagen:

|         | L-Flocke  | H-Flocke  | G-Flocke           |
|---------|-----------|-----------|--------------------|
| 3. Tag  | vorhanden | aufgelöst | kompakt            |
| 10. Tag | Fb-Reste  | -         | viele Fb-Flöckchen |
| 14. Tag | -         | -         | -                  |

### Zusammenfassung

Der rasche Zerfall der "Heparinoid-Fibrinflocke" im Zusammenhang mit der Beobachtung einer Resynthesestörung durch Heparinoid (s. S. 45) macht eine Aktivierung fibrinolytischer Substanzen (Plasmin, Thrombin E) wahrscheinlich. Es wäre auch denkbar, daß eine Veränderung der polymerisierenden

<sup>†</sup>) L Leerversuch H Heparinoidversuch G Gelatineversuch

Fb-Monomeren ein strukturell fehlgebildetes Gerinnsel entstehen läßt, das unter der, wenn auch geringen, fibrinolytischen Wirkung von 2,7 % Harnstoff (Verdünnung 1:10) und Plasminspuren (65) unbeständiger ist.

Demgegenüber erwies sich Gelatine (Merck) in unseren Versuchen als thromboplastisch - die RP-Zeit wurde verkürzt - und als Stabilisator, d. h. Fibrinolyse-Hemmer.

Hierzu sei erwähnt, daß vom Plasmaexpander Haemaccel (Gelatine, Behringwerke) bekannt ist, daß er als "Fibrinkettenverstärker" (R. Marx) wirkt.

Genauerer über die Wirkungsweise von zugesetzten Substanzen läßt sich, da man über die reine Resynthese schon nichts Sicheres weiß (61), nicht aussagen.

#### Versuche zur Repolymerisationshemmung über Thrombininaktivierung

Wie bereits erwähnt (s. S. 34), hält Seegers an der Auffassung fest, Thrombin sei für die Repolymerisation verantwortlich.

Aus diesem Grunde wurde zunächst untersucht, ob Th-Zusatz zur Verdünnungsflüssigkeit irgendeinen Einfluß auf die RP-Zeit hat.

Beobachtung der Resynthese bei steigenden Mengen von Thrombin, das bereits bei der Fibrinherstellung zugesetzt wurde:

0,5 ccm Fgen

0,05 ccm Sequ.

0,1 ccm Th (n E)

| Ansatz        | a  | b      | c      | d      | e   |
|---------------|----|--------|--------|--------|-----|
| E Th/ccm Fgen | 20 | 10     | 2      | 1      | 0,5 |
| Ger. -Zeit    | 1' | 1' 53" | 3' 17' | 8' 10" | 12' |

Alle Ansätze blieben 12 Stunden bei Zi. T. stehen, dann kamen die Gerinnsel in je 1 ccm Harnstoff. Die Lysis war nach 60 Min. in allen Fällen vollständig.

Es wurde nun die Resynthese-Geschwindigkeit beobachtet:

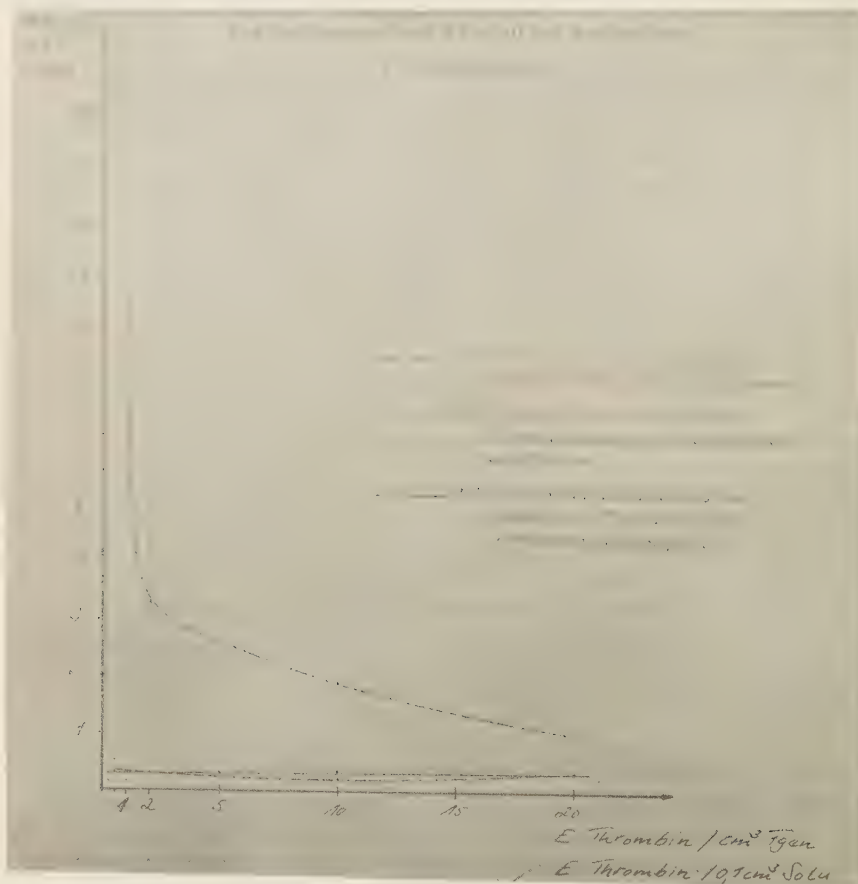
| Solu aus Ansatz | a     | b   | c     | d   | e    |
|-----------------|-------|-----|-------|-----|------|
| RP-Zeit         | 19,6" | 13" | 16 6" | 7.6 | 30.6 |

Ergebnis: Die Resynthese-Zeiten waren zwar unterschiedlich, jedoch ganz unabhängig von der Thrombinmenge des Ansatzes.

Die RP-Zeit bei Zusätzen von verschiedenen Thrombinmengen zur Verdünnungsflüssigkeit:

Ansatz  $c_2$ : 1 ccm  $H_2O$  + 0,1 ccm Th (nE) + 0,1 ccm Solu<sub>1</sub> (ca. 60 Min. alt)

| Ansatz       | $a_2$ | $b_2$ | $c_2$ | $d_2$ | $e_2$ |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| E Th. Ansatz | 10    | 5     | 1     | 0,5   | 0,25  |
| RP-Zeit      | 20"   | 19"   | 19"   | 20"   | 18"   |



### Ergebnis:

Das zugesetzte Thrombin nahm auf die Resynthese-Geschwindigkeit keinerlei Einfluß. Dies spricht für die von Latallo e. a. (47) vertretene Auffassung, daß Th keine Polymerase sei.

#### Zusatzversuch:

Der eben beschriebene Versuch wurde dahingehend abgewandelt, daß Solu-Fibrin 1. mit NaCl-gelöstem Thrombin und 2. mit Thrombin, das 3 Stunden bei Zi. T. in Harnstoff gestanden war, 1:1 verdünnt wurde, um zu sehen, ob bei der nachfolgenden A. dest. -Probe ein Unterschied in der RP-Zeit sei.

Nach Seegers müsste das in Harnstoff gelöste Thrombin nach 3 Stunden inaktiv sein, während das NaCl-gelöste noch voll wirksam sein müsste.

Die Wirkung von NaCl- und Harnstoff gelöstem Thrombin:

| Inkubationsgemisch                                  | Inkub-Zeit | Resynthese bei Verdünnung<br>mit H <sub>2</sub> O 1:10 |
|-----------------------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------|
| 1) Solu: phys. NaCl=1:1                             | 5'         | sofort schöne Flocke: "fine"                           |
| 2) Solu: Th <sub>(15 E in<br/>phys. NaCl=1:1</sub>  | 5'         | " " " "                                                |
| 3) Solu: Harnstoff <sub>(m4, 5)<br/>1:1</sub>       | 5'         | sofort Tr. , durch Schütteln<br>"Flocken": "coarse"    |
| 4) Solu: Th <sub>(15 E in<br/>Harnst. ) = 1:1</sub> | 5'         | sofort Tr. , durch Schütteln<br>"Flocken": "coarse"    |

### Ergebnis:

Die Wirkung von Th<sub>Harnstoff</sub> und Th<sub>NaCl</sub> ist tatsächlich deutlich unterschieden. Wie die Leerversuche mit NaCl und Harnstoffverdünnung zeigen, beruht dies jedoch offensichtlich auf der stufenweisen Herabsetzung der Harnstoffkonzentration (Spalte 1 und 2).

#### Die Resynthese unter Zusatz von Thrombin-Inaktivatoren

Obwohl die Vorversuche nicht für eine Thrombinabhängigkeit der Resynthese sprechen, sollte dennoch das Solu-Fibrin mit Reagenzien behandelt werden,

deren inaktivierende Wirkung auf Thrombin bekannt ist.

Nach einem Vorschlag von G. Schwick (Marburg) wurde zunächst Solu 5 Min. bei 80° C gehalten, einer Temperatur, die für Thrombin absolut unzumutbar ist.

Die nachfolgende A. dest. -Probe ließ noch Fibrin-Flocken entstehen, wenngleich diese kleiner, dafür aber dichter waren als die aus unerhitztem Material.

Erst Temperaturen von 100° C machten eine Resynthese unmöglich, was bei dem damit verbundenen "Fibrin-Tod" nicht erstaunlich ist.  
Ergebnis: Die positive A. dest. -Probe des auf 80° C erhitzten Solu spricht gegen eine Notwendigkeit des Thrombin

#### a) Versuche mit dem Thrombin-Inaktivator Dopa

Nach Rieben (nach 56) inaktivieren 5  $\gamma^+$  Dihydroxyphenylalanin innerhalb von 2 Stunden 88 % von 1 ccm Thrombinlösung. Größere Dosen seien direkt wirksam.

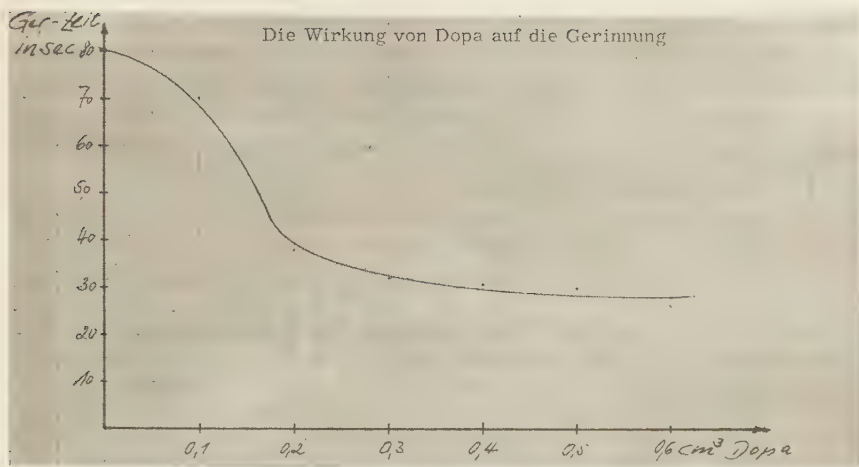
Die Auflösung von Dopa in H<sub>2</sub>O bereitete Schwierigkeiten. Nach Angaben der Universitäts-Apotheke sollte es 1:200 in kaltem Wasser löslich sein. Wir vermochten nur eine 0,1 %ige Lösung herzustellen, und zwar bei 50° C.

Die Ger. -Zeit unter Zusatz von steigenden Mengen Dopa:

Ansatz: 0,5 ccm Fgen + n Dopa + 0,35 ccm Th

| Dopa (0,1 %ig)ccm | 0   | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,6 |
|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ger. -Zeit        | 80" | 70" | 38" | 32" | 31" | 30" | 26" |

+ ) 2,5 M x 10<sup>-4</sup>



Ergebnis: Von einer thrombininaktivierenden Wirkung kann hier nicht die Rede sein. Daher sollte Thrombin längere Zeit mit Dopa inkubiert werden.

Die Ger.-Zeit unter Zugabe von 55 Stunden bei 4° C mit Dopa Lösung inkubiertem Thrombin: (Fgen<sub>a</sub> = prothrombinfrei, Fgen<sub>n</sub> = normale Lösung)

|                    | Th:H <sub>2</sub> O=10:1 |       | Th:Dopa=1:10   |       | Th:H <sub>2</sub> O=1:1 |       | Th:Dopa = 1:1   |       |
|--------------------|--------------------------|-------|----------------|-------|-------------------------|-------|-----------------|-------|
| Fgen               | a                        | n     | a              | n     | a                       | n     | a               | n     |
| Ger. - Zeit        | 125"                     | 1'20" | 1'27"          | 1'28" | 4'50"                   | 4'45" | 3'10"           | 3'31" |
| Farbe nach 24 Std. | weiß                     |       | grau           |       | weiß                    |       | schwarz         |       |
| L-Zeit             | 1-2Std. 1-2Std           |       | 36 Std. 24 Std |       | 1 Std. 1 Std.           |       | 96 Std. 96 Std. |       |

Ergebnis: Auch hier zeigte Dopa nicht die erwartete Wirkung einer totalen Thrombinhemmung. Es bringt nur eine Verzögerung der Gerinnselbildung.

+) Die raschere Gerinnung beruht auf der Herabsetzung der NaCl-Konzentration; Die Ger. -Zeit ist der Ionenkonzentration proportional (19).

Um jegliche Verdünnung<sup>+) auszu-schalten, wurde Solu-Fibrin mit kristallinem Dopa ausgeschüttelt: 15 mg Dopa/ccm Solu wurden 15 Min. geschüttelt, das ungelöste Dopa abzentrifugiert und anschließend die A. dest. -Probe gemacht.</sup>

| Solu <sub>1</sub> | ohne Zusatz  | 15' geschüttelt | 1:10 H <sub>2</sub> O | + A. dest. -Probe |
|-------------------|--------------|-----------------|-----------------------|-------------------|
| Solu 1            | + 15 mg Dopa | 15'             | " "                   | + " "             |
| Solu <sub>5</sub> | " "          | 15'             | " "                   | + " "             |

Ergebnis: Auch in dieser Versuchsanordnung konnten wir nicht das erhoffte Ergebnis erzielen.

b) Versuche zur RP-Hemmung mit den Th-Inaktivatoren KMnO<sub>4</sub> und Trypanblau

Nach Laki (78) ist es möglich, die Polymerisation eines Fibrinogen-Thrombin-Gemisches durch Zugabe von 1/50 vol einer 1,41 x 10<sup>-3</sup>m KMnO<sub>4</sub>-Lösung zu unterbinden.

Ein Versuch wurde gemacht, ob eine Inkubation von Solu mit 1/20 vol einer entsprechenden KMnO<sub>4</sub>-Lösung die Resynthese vereiteln könnte; es gelang nicht.

Dasselbe gilt für die Inkubation von Solu mit 1/10 vol einer 0,1 %igen Trypanblau-Lösung, die nach Seegers (74) Thrombin in seiner Aktivität stört.

### Zusammenfassung

Das Ergebnis der Versuche mit Dopa, KMnO<sub>4</sub> und Trypanblau ist nicht eindeutig; entweder sind die Reagenzien unter den angewandten Bedingungen keine Thrombin-Inaktivatoren, oder Thrombin ist zur Resynthese nicht notwendig.

c) Versuch einer Thrombin-Hemmung mit Progressiv-Antitrombin

Da die bi-herigen Untersuchungen die Wirksamkeit von Thrombin bei der Resynthese nicht sicher ausschließen konnten, wurden die Solu-Präparate so behandelt, als sei Thrombin in ihnen wirksam und müsste mit Antithrombin, wie es sich in frischem Blut befindet, abgefangen werden, und zwar durch Inkubation mit Citratblut bzw. Citratplasma über 60 Min. (59a). Nach Gerendas (25) müsste diese Inkubationszeit bei weitem ausreichen, um das Thrombin zu inaktivieren, sei es durch Adsorption, die bei tieferen Temperaturen überwiege, oder durch fermentative Hemmung. Der Autor sagt, daß die Adsorption, durch Verdünnen eines reinen Thrombin-Serum-Gemisches wieder aufgehoben wer-

den könne. Nach Seegers (75); 76) kommt es nur am Fibringerinnsel selbst zur Adsorption, während das im Serum oder Plasma vorhandene Progressiv-Antithrombin nach der Gleichung von Miachealis-Menton  $\text{Th} + \text{Ath} \rightleftharpoons \text{ThAth} \rightarrow (\text{PA}) + \text{Th}$  große Mengen von Thrombin in einem inaktiven Komplex (ThAth) bindet. Dieser Komplex sei sehr stabil und habe die Tendenz, sich rasch zu bilden (bes. bei pH 8,5), wenn die Konzentration von Antithrombin (Ath) relativ hoch ist. Die Dissoziation in ein inaktives Antithrombin (PA) werde durch hohen Th-Gehalt begünstigt (73).

#### I. Vorversuch zur Thrombininaktivierung mit Antithrombin

Es musste untersucht werden, ob Harnstoff Thrombin in seiner Wirksamkeit beeinflusst (s. 1) und ob Antithrombin III in Gegenwart von Harnstoff noch wirksam ist (s. 2).

A) Es wurden jeweils 0,2 ccm Fgenlösung (0,2%) mit 0,2 ccm Th, welches in phys. NaCl (a) bzw. in m 4,5  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  (b) gelöst war, versetzt.

a) 60 E Th, in 1 ccm phys. NaCl gelöst, werden in bestimmten Zeitabständen nach der Auflösung dem Fgen zugesetzt und die Gerinnungszeiten gestoppt; ebenso wurden Verdünnungen (s. 2) und 3)) des in phys. NaCl gelösten Th untersucht.

| Zeit nach d. Auflösung des Th in phys. NaCl                     | 0               | 15'   | 45'   |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------|-------|-------|
| Thrombinlösung:                                                 | Gerinnungszeit: |       |       |
| 1) unverdünnt (12 ETh/0,2 ccm Fgen)                             | 6,5"            | 6,2"  | 6,5"  |
| 2) 1:5 verdünnt (2,4 ETh/0,2 ccm Fgen) mit $\text{H}_2\text{O}$ | 10,5"           | 10,4" | 10,5" |
| 3) 1:10 verdünnt (1,2 ETh/0,2 ccm Fgen) " "                     | 12,8"           | 12,8" | 12,5" |

Ergebnis: Wie erwartet, nimmt die Aktivität von Th in phys. NaCl in der kurzen Zeit bei Zimmertemperatur nicht ab; daß die Thrombinzeit der verdünnten Th-Lösungen (s. 2 u. 3) verlängert ist, ist verständlich.

b) 60 ETh in m 4,5 Harnstoff gelöst, werden zur Fgenlösung zugegeben.

| Zeit nach der Auflösung<br>d. Th in $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ : | 0               | 5'    | 15'   | 30' | 45' | 60' |
|------------------------------------------------------------------|-----------------|-------|-------|-----|-----|-----|
| Thrombinlösung:                                                  | Gerinnungszeit: |       |       |     |     |     |
| 1) unverdünnt                                                    | > 2'            |       |       |     |     |     |
| 2) 1:5 verdünnt                                                  | 43,0"           | 44,0" | 45,5" | 45" | 45" | 45" |
| 3) 1:10 verdünnt                                                 | 25,5"           | 29,5" | 36"   | 31" | 31" | 31" |

Ergebnis: Die Gerinnungshemmung durch Harnstoff ist der Konzentration desselben proportional, d. h. bei Verdünnen der Harnstoff-Thrombinlösung mit phys. NaCl wird Th wieder wirksam. Die "Inkubation" von 60 Min. bringt nur eine geringe Abnahme der Th-Aktivität mit sich

B) In phys. NaCl bzw. Harnstoff gelöstes Thrombin wurde mit Plasma versetzt i. e. einer Antithrombin III-Wirkung ausgesetzt und in bestimmten Zeitabständen durch Zugabe von Fgen auf seine Aktivität geprüft.

c) 60 ETh in 1 ccm phys. NaCl + 1 ccm defibriniertes<sup>+)</sup> Plasma (2 u. 3 Verdünnungen des Th-Plasmagemisches mit phys. NaCl)

| Inkub. Z. des Th-Plasma-<br>gemisches |   | 0     | 5'    | 15'   | 30' | 45' |
|---------------------------------------|---|-------|-------|-------|-----|-----|
| Ger. Z.                               |   |       |       |       |     |     |
| Th-Plasma- 1) unver-<br>gemisch dünn  | " | 11,5" | 21,5" | 54"   | 90" | 2'  |
| 2) 1:5 ver-<br>dünn                   | " | 20,0" | 30"   | 73"   | 96" | 2'  |
| 3) 1:10 ver-<br>dünn                  | " | 25,5" | 45"   | 52,5" | 86" | 2'  |

d) 60 E Th in 1 ccm  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ -Lösung + 1 ccm Plasma  
(2 u. 3: Verdünnungen des Ansatzes mit phys. NaCl)

| Inkubationszeit des Th-Plasma-<br>gemisches |                    | 0           | 15' | 30'   | 40'   |
|---------------------------------------------|--------------------|-------------|-----|-------|-------|
|                                             |                    | Ger. - Zeit |     |       |       |
| Th-Plasma-<br>gemisch                       | 1) unver-<br>dünnt | "           | 2   |       |       |
|                                             | 2) 1:5 verd.       | "           | 23" | 40,5" | 61,5" |
|                                             | 3) 1:10            | " "         | 37" | 54"   | 78"   |
|                                             |                    |             |     |       | 57,5" |

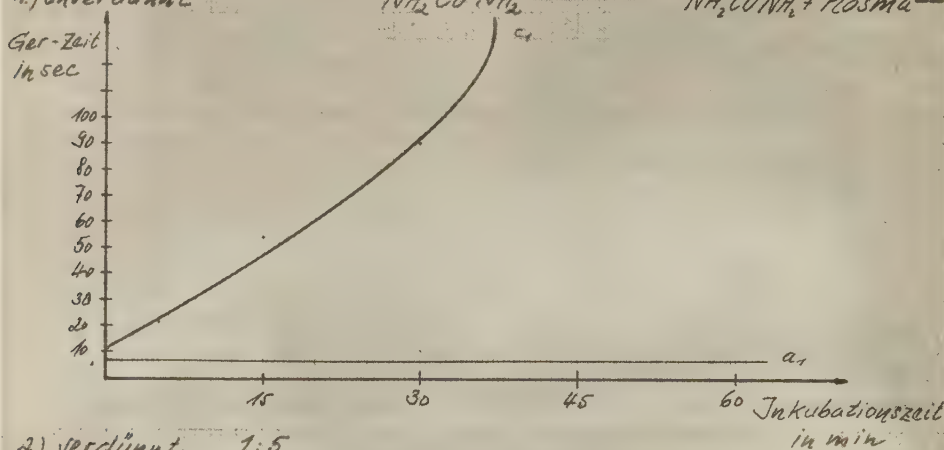
Ergebnis: Es scheint, daß Harnstoff bei längerer Einwirkung die Antithrombinwirkung hemmt, ohne sie zu zerstören, da die Gerinnungszeiten unter denjenigen des in phys. NaCl gelösten, mit Plasma inkubierten Thrombins liegen und sich erst bei Herabsetzen der Harnstoffkonzentration (Verdünnung 1:10) angleichen. Dies gilt vor allem für die Inkubationsdauer über 15 Min. Die Tatsache verdient Beachtung, da eine zu erwartende Addition der Harnstoff- und Plasma-Antithrombinwirkung zu einer deutlichen Verlängerung der Thrombinzeit hätte führen können.

+) Citratplasma wird 5 Min. bei  $56^{\circ}\text{C}$  gehalten, das Hitze-Fibrin wird abzentrifugiert.

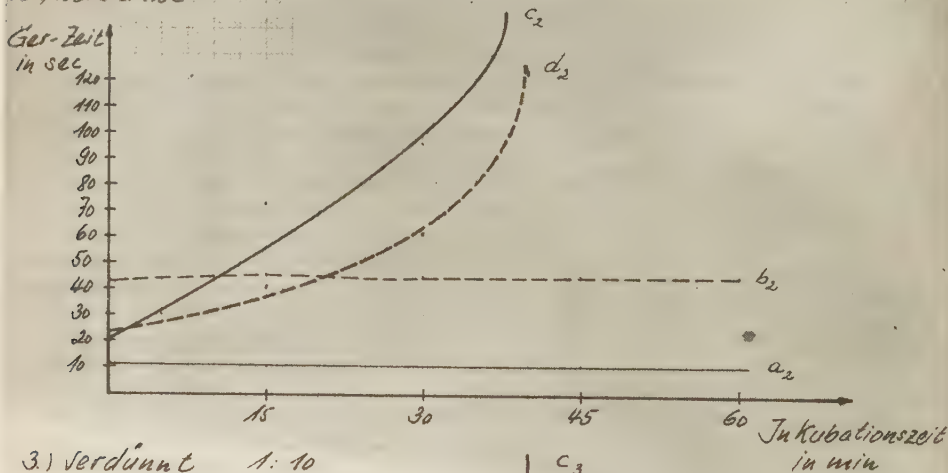
# Die Aktivität von Thrombin bei verschiedenen Längen

intens. Einwirkung von:  $\text{NaCl}$  —————  $\text{NaCl} + \text{Plasma}$  —  
 $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  ————  $\text{NH}_2\text{CONH}_2 + \text{Plasma}$  —

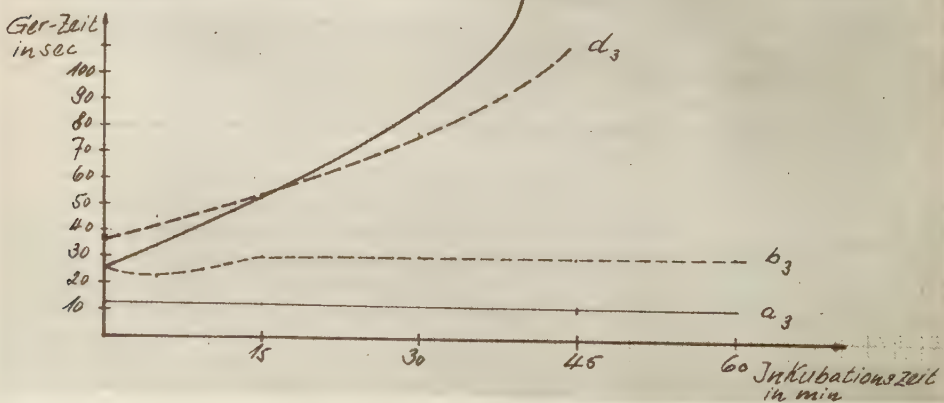
1.) unverdünnt



2.) verdünnt 1:5



3.) Verdünnt 1:10



### Zusammenfassung:

Die Vorversuche zur Th-Inaktivierung zeigten, daß Progressivantithrombin, wenn auch abgeschwächt, in Gegenwart von Harnstoff noch wirksam ist.

### II Versuche zur Resynthese bei Thrombin-Inaktivierung mit Progressiv-Antithrombin - nach Seegers (nach 3) Antithrombin III.

Zunächst hatte ich die Erfahrungen von Kutzinsky (59a) übernommen, wonach die Inkubation von Solu mit Citratblut die Resynthese verhinderte, bis mir eines Tages auffiel, daß sich im Citratblut-Solu<sub>6</sub>-Gemisch durchscheinende Gerinnsel befanden, die ganz unseren üblichen Solu-Gerinnseln gleichen, nur daß sie blutig tingiert waren. Das hierbei verwendete Solu<sub>6</sub> war nicht vorher eingefroren, sondern ganz frisch verwendet worden.

Da Hasencitratblut bekanntlich leicht angerinnt, zumal wenn die Entnahme schwierig ist, wurde die Gerinnselbildung darauf zurückgeführt.

Die Beobachtung beunruhigte mich jedoch sehr, und ich fing an, Citratblut-Solu-Gemische auf ihre Resynthetisierbarkeit bei der Verdünnung zu untersuchen.

Die Verdünnung von Inkubationsgemischen = A. dest. -Probe

a) Citratblut -Solu

b) Citratplasma-Solu (s. S. 59)

Einmal wurde ein Solu-Fibrin inkubiert, das zwar noch repolymerisierbar war, jedoch in einzelnen Fibrinfasern nicht als einheitliche große Flocken.

Bei der Verdünnung nach 1, 2, 3, 5, 10, 20 Min. Inkubation mit Citratplasma konnte keine eindeutige Aussage über die Resynthese gemacht werden; es zeigten sich kleine "Erythrozyten-Anballungen", so daß auch hier eher von einem positiven Ausfall der Probe gesprochen werden muß.

Das Inkubationsgemisch wurde auf einen Filter aufgetropft; dabei zeigte sich kein Gerinnsel.

Nach Art eines Blutbildes hergestellte und gefärbte Ausstriche des Inkubationsgemisches zeigten Erythrozyten und Leukozyten in einem hellrosa gefärbten Netz von Fibrin-Fasern. - Mit Verdunsten der Flüssigkeit musste auch die Aktion des Lösungsmittels Harnstoff erlöschen.

Ergebnis: Zusammenfassend muß gesagt werden, daß die Inkubation von Solu mit Citratblut oder -plasma kein Mittel ist, zur Verhinderung der Resynthese bei nachfolgender Verdünnung. Daraus folgt: Da Thrombin durch das enthaltene Progressiv-Antithrombin hätte gehemmt werden müssen(s. o.),

| Verdünn.         | Inkubationsgem. (I→V):                               | Inkubationszeit |     |     |     |     |     |     |      |      |      |
|------------------|------------------------------------------------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|
| mittel           |                                                      | 15'             | 30' | 40' | 60' | 75' | 80' | 95' | 135' | 150' | 180' |
|                  | I Solu <sub>6</sub> :Cit.blut <sub>Kan</sub> =1:1    |                 |     |     |     |     |     |     |      |      |      |
| H <sub>2</sub> O |                                                      | +               | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +    | +    | A    |
| NaCl             |                                                      |                 |     |     |     |     |     | +   | +    | +    | q    |
| Cit. Pl.         |                                                      |                 |     |     |     | +   |     |     |      |      | u    |
| <hr/>            |                                                      |                 |     |     |     |     |     |     |      |      |      |
|                  | II Solu <sub>6</sub> :Cit.blut <sub>MW</sub> =1:1    |                 |     |     |     |     |     |     |      |      | a    |
| NaCl             |                                                      | +               | +   | +   | +   |     |     |     |      |      | d    |
| H <sub>2</sub> O |                                                      | +               | +   | +   | +   |     |     |     |      |      | e    |
| <hr/>            |                                                      |                 |     |     |     |     |     |     |      |      |      |
|                  | III Solu <sub>6</sub> :Cit. Pl <sub>MW</sub> =2, 5:1 |                 |     |     |     |     |     |     |      |      | s    |
| H <sub>2</sub> O |                                                      | +               | +   | +   | +   |     |     |     |      |      | t    |
| <hr/>            |                                                      |                 |     |     |     |     |     |     |      |      |      |
|                  | IV Solu <sub>6</sub> :Cit. Pl <sub>MW</sub> =1, 5:1  |                 |     |     |     |     |     |     |      |      | P    |
| H <sub>2</sub> O |                                                      | +               | +   | +   | +   |     |     |     |      |      | r    |
| <hr/>            |                                                      |                 |     |     |     |     |     |     |      |      |      |
|                  | V Solu <sub>6</sub> :Cit. Pl <sub>MW</sub> =1:1      |                 |     |     |     |     |     |     |      |      | b    |
| H <sub>2</sub> O |                                                      | +               | +   | +   | +   |     |     |     |      |      | e    |
| <hr/>            |                                                      |                 |     |     |     |     |     |     |      |      |      |
| Leerver-         | Solu <sub>6</sub> :Oxalat. Pl. =1:10                 | +               |     |     |     |     |     |     |      |      |      |
| suche:           | Solu <sub>6</sub> :Cit. Pl <sub>MW</sub> =1.2        | ÷               |     |     |     |     |     |     |      |      | n    |

Verdünnung von Inkubationsgemischen (Solu/Cit. blut (-plasma) v. Kaninchen  
(Solu/Cit. blut (-plasma) v. Menschen)

| Verdünn.                    | Inkubationsgem. (I→IV):                            | Inkubationszeit     | (Sofort - u. Kontroll |    |
|-----------------------------|----------------------------------------------------|---------------------|-----------------------|----|
| mittel                      | I Solu <sub>6</sub> :Cit. blut <sub>Kan</sub> =1:1 | 15' 30' 45' 60' 80' | wert)                 | A. |
| H <sub>2</sub> O            |                                                    | ++ ++ ++ ++         |                       | d  |
| Cit. Pl. MW <sup>+) )</sup> |                                                    | ++ - ? ++ - +       |                       | e  |
| Hep. Pl. Kan <sup>++)</sup> |                                                    | ++ ++ ++ ++         |                       | s  |
| H <sub>2</sub> O            |                                                    |                     | ++                    | t  |
| Cit. Pl. MW                 |                                                    |                     | ++                    | P  |
| Cit. Pl. Kan                |                                                    |                     | + ?                   | r  |
| Hep. Pl. MW                 |                                                    |                     | ++                    | o  |
| Hep. Pl. Kan                |                                                    |                     | - .                   | b. |

+ ) Silikonisierte Geräte, ++ ) Hep. Pl. :5 mg Heparin/10 ccm Blut

| Verdünnungsmittel                          |                    | Inkubationsgemisch (II IV):<br>II Solu <sub>6</sub> :Cit. blut. MW=1:1 |  | Inkubationszeit |     | (Sofort- und Kontrollwert) |     | A<br>q<br>u<br>a<br>d<br>e<br>s<br>t<br>P<br>r<br>o<br>b<br>e<br>n |
|--------------------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------------------------|--|-----------------|-----|----------------------------|-----|--------------------------------------------------------------------|
|                                            |                    |                                                                        |  | 15'             | 30' | 45'                        | 60' |                                                                    |
| 20 °C                                      | H <sub>2</sub> O   |                                                                        |  | -               | ++  | ++                         | ++  | 80'                                                                |
|                                            | Cit. Pl. MW        |                                                                        |  | -               | ++  | ++                         | ++  |                                                                    |
|                                            | Hep. Kan           |                                                                        |  | -               | -   | (+)(+)                     | -   |                                                                    |
| 37 °C                                      | Cit. Pl. MW        |                                                                        |  | ++              | ++  | ++                         | ++  |                                                                    |
|                                            | Hep. Pl. Kan       |                                                                        |  |                 |     |                            |     | ++                                                                 |
|                                            | H <sub>2</sub> O   |                                                                        |  |                 |     |                            |     | ++                                                                 |
|                                            | Cit. Pl. Kan       |                                                                        |  |                 |     |                            |     | ++                                                                 |
|                                            | Hep. Pl. MW        |                                                                        |  |                 |     |                            |     | ? -                                                                |
| III Solu <sub>6</sub> : Cit. Pl. Kan = 1:1 |                    |                                                                        |  |                 |     |                            |     |                                                                    |
| 20 °C                                      | H <sub>2</sub> O   |                                                                        |  | ++              | ++  | ++                         | ++  |                                                                    |
|                                            | Cit. Pl. MW        |                                                                        |  | -               | -   | (+)                        | -   |                                                                    |
|                                            | Hep. Pl. Kan       |                                                                        |  | ++              | ++  | ++                         | ++  |                                                                    |
| 37 °C                                      | H <sub>2</sub> O   |                                                                        |  |                 |     |                            |     | ++                                                                 |
|                                            | Cit. Pl. MW        |                                                                        |  |                 |     |                            |     | ? -                                                                |
|                                            | Cit. Pl. Kan       |                                                                        |  |                 |     |                            |     | ? -                                                                |
|                                            | Hep. Pl. MW        |                                                                        |  |                 |     |                            |     | ++                                                                 |
|                                            | Hep. Pl. Kan       |                                                                        |  |                 |     |                            |     | ? -                                                                |
| IV Solu <sub>6</sub> : Cit. Pl. MW = 1:1   |                    |                                                                        |  |                 |     |                            |     |                                                                    |
| 20 °C                                      | H <sub>2</sub> O   |                                                                        |  | ++              | ++  | ++                         | ++  |                                                                    |
|                                            | Cit. Pl. MW        |                                                                        |  | ++              |     | ? -                        |     |                                                                    |
|                                            | Hep. Pl. Kan       |                                                                        |  | ++              | ++  | ++                         | ++  |                                                                    |
| 37 °C                                      | H <sub>2</sub> O   |                                                                        |  |                 |     |                            |     | ++                                                                 |
|                                            | Cit. Pl. MW        |                                                                        |  |                 |     |                            |     | ? +                                                                |
|                                            | Cit. Pl. Kan       |                                                                        |  |                 |     |                            |     | -                                                                  |
|                                            | Hep. Pl. MW        |                                                                        |  |                 |     |                            |     | ++                                                                 |
|                                            | Cit. Pl. (Gemisch) |                                                                        |  |                 |     |                            |     | -                                                                  |

scheint es für die Repolymerisation nicht notwendig zu sein

### III. Versuche zur RP-Hemmung mit Antithrombin II (76)

Da es ja hätte sein können, daß das Progressiv-Ath bei den für seine Wirkung nicht gerade optimalen Bedingungen (s. S. 56) nicht so aktiv ist, sollte noch der "Coinhibitor" (Ath II) + Heparin als Thrombinhemmer ausgenutzt werden.

Nach Seegers (74) stellt sich die Reaktion folgendermaßen dar:

a) Heparin + Thrombin-Coinhibitor = Thrombininhibitor

b) Thrombininhibitor + Thrombin  $\rightarrow$  inaktive Thrombinverbindung

Versuchsanordnung: Um den Thrombininhibitor zu erhalten, wurde zunächst frisches Plasma 45 Min. mit fallenden Mengen von Heparinoid G 31150 gemischt und anschließend Solu mit diesem heparinisierten Plasma 1:1 versetzt und wie üblich 60 Min. inkubiert.

| Verdünnung                | 1:1 = Solu:Cit Plasma mit Heparinoid<br>(n mg/ccm Plasma) |     |    |   |     |     |      |      |      |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------|-----|----|---|-----|-----|------|------|------|
|                           | 100                                                       | 50  | 10 | 1 | 0,5 | 0,1 | 0,05 | 0,01 | 0 mg |
| 1:20 H <sub>2</sub> O 60' | +                                                         | (+) | +  | + | +   | +   | +    | +    | +    |
| 120'                      | +                                                         | +   | +  | + | +   | +   | +    | +    | +    |
| 1:10<br>Plasma 30'        | +                                                         | (+) | +  | + |     | +   |      | +    | +    |
| 60'                       | +                                                         |     | +  | + | +   | +   |      | +    | +    |
| 120'                      | +                                                         |     | +  |   |     | +   |      |      | +    |
| 1:10Pl + 50 mg<br>Hep.    | .                                                         | .   | .  | . | .   | .   | .    | .    | .    |

Leerversuch Solu<sub>1</sub>:Cit. Pl = 1:10

nach 15', 30', 60', 120' :

In einer zweiten Versuchsserie wurde Plasma, mit Heparin Novo in wechselnden Mengen versetzt, zu verschiedenen Solu-Präparaten gegeben:

| Verdünnung                                                 | Inkubationsgemisch<br>Solu <sub>1</sub> :Cit. Pl(+ 0,25 mg Hep/<br>ccm Pl) = 1:1 | Inkubationszeit |     |     |      |
|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----|-----|------|
|                                                            |                                                                                  | 30'             | 45' | 60' | 120' |
| 1:10                                                       |                                                                                  | +               |     | +   |      |
| 1:20 Plasma                                                |                                                                                  | +               |     |     |      |
| 1:20 H <sub>2</sub> O                                      |                                                                                  |                 |     |     | -    |
| Solu <sub>2</sub> :Cit. Pl(+ 0,25 mg Hep/<br>ccm Pl) = 1:1 |                                                                                  |                 |     |     |      |
| 1:10                                                       |                                                                                  |                 |     |     |      |
| 1:20 Plasma                                                |                                                                                  | +               |     | +   | +    |
| 1:20 H <sub>2</sub> O                                      |                                                                                  |                 |     |     | -    |
| Solu <sub>5</sub> :Cit. Pl(+ 0,25 mg Hep/<br>ccm Pl) = 1:1 |                                                                                  |                 |     |     |      |
| 1:20 Plasma                                                |                                                                                  | +               | +   |     |      |
| 1:20 H <sub>2</sub> O                                      |                                                                                  | +               | +   |     | -    |
| Solu <sub>4</sub> :Cit. Pl(+ 25 mg Hep/<br>ccm Pl) = 1:1   |                                                                                  |                 |     |     |      |
| 1:10                                                       |                                                                                  |                 |     | -   | -    |
| 1:20 Plasma                                                |                                                                                  |                 |     | -   | -    |
| 1:10 H <sub>2</sub> O                                      |                                                                                  |                 |     | -   | -    |
| 1:20 H <sub>2</sub> O                                      |                                                                                  |                 |     | -   | -    |

Der letzte Versuch mit 25 mg Hep/ccm Plasma ließ die Hoffnung aufkommen, daß irgendwo zwischen 0,25 und 25 mg Hep/ccm Pl die Grenze für die Wirksamkeit liegen müsste; es wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt.

Austitrieren der für den Coinhibitor notwendigen Menge

Heparin n :

Verdün- 1:1 = Solu<sub>1</sub>:Cit Plasma + (Heparinoid mg/ccm Plasma)

nung n: 25 10 5 2,5 1 0,5 0,25 0,05 0 mg

1:10/20

|                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 60' Cit Pl                   | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 75' Oxalat Pl                | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 80' H <sub>2</sub> O (1:20!) | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Ergebnis: Die Befunde einer Resynthese-Hemmung bei Verdünnung mit Plasma aus dem Vorversuch (s. oben) dürften zufallsbedingt sein, Was die mangelnde Repolymerisation bei der Verdünnung mit H<sub>2</sub>O angeht, sind wir über die Ursache nicht im klaren; für unsere Tierexperimente ist dies zunächst nicht von Bedeutung.

Weder Heparinoid noch Heparin Novo konnten, mit Plasma vermischt, die Resynthese des Solufibrin verhindern.

Trotzdem sollte noch einmal mit einer anderen Fibrinogen-Charge ein Versuch unternommen werden, zumal - wie bei den Tierexperimenten gezeigt wird - eine Menge von 50 mg/kg Körpergewicht von -Heparin Novo die Resynthese in vivo zu hemmen scheint.

I. Inkubation von Solu mit Heparinplasma von Kaninchen

II. Inkubation von Solu mit Heparinplasma vom Menschen (MW)

Heparinplasma = 10 ccm Blut + 5 mg Heparin

I.

Aqua dest Proben

|     | Verdünnung       | Inkubationsge-<br>misch u. -zeit | 15' | 45' | 60' | 180' | 48Std. |
|-----|------------------|----------------------------------|-----|-----|-----|------|--------|
|     | 1:10             | Solu:Hep.<br>Pl. Kan. =1:1       |     |     |     |      |        |
| 20° | H <sub>2</sub> O |                                  | - ? | ++  | ++  |      | -      |
|     | CitPl MW         |                                  | ++  | ??  | ++  |      |        |
|     | HepPl Kan.       |                                  | ? + | - + |     |      |        |
| 37° | H <sub>2</sub> O |                                  |     |     |     | ++   |        |
|     | CitPl MW         |                                  |     |     |     | ??   |        |
|     | CitPl Kan.       |                                  |     |     |     | ++   | -      |
|     | HepPl MW         |                                  |     |     |     | ++   | +      |
|     | CitPl (gem.)     |                                  |     |     |     | ? -  |        |

Leerversuch Solu: x = 1:10

|     |                  |   |
|-----|------------------|---|
| 37° | H <sub>2</sub> O | + |
|     | CitPl MW         | + |
|     | CitPl Kan.       | + |
|     | HepPl MW         | + |
|     | CitPl (gem.)     | + |

| °C  | Verdün-<br>nung  | Inkubationsge-<br>misch u. -zeit                 | 15'   | 45' | 60' | 180'  | 48Std. |
|-----|------------------|--------------------------------------------------|-------|-----|-----|-------|--------|
|     | 1:10             | Solu <sub>1</sub> :Hep.<br>Pl <sub>MW</sub> =1:1 |       |     |     |       |        |
| 20° | H <sub>2</sub> O |                                                  | - (?) | ++  | ++  |       | -      |
|     | CitPl MW         |                                                  | -     | -   | -   |       |        |
|     | HepPl Hase       |                                                  | ? +   | ? + |     |       |        |
|     | H <sub>2</sub> O |                                                  |       |     |     | (+) + |        |
|     | CitPl MW         |                                                  |       |     |     | ? -   |        |
| 37° | CitPl Hase       |                                                  |       |     |     | + +   |        |
|     | HepPl MW         |                                                  |       |     |     | + +   |        |
|     | CitPl (gem.)     |                                                  |       |     |     | ? -   |        |

Die Plasmen kamen nur mit silikonisierten Oberflächen in Berührung, damit sie möglichst unverändert waren.

Ergebnis: Auch bei Inkubation von Solufibrin<sub>1</sub> mit Heparinplasma (5 mg/10ccm Blut) und nachfolgender Verdünnung mit Citrat-, Heparinplasma oder A. dest. kam es in unseren Versuchen - wenn auch verzögert - zur Resynthese.

Daß nach einstündiger Inkubationsdauer von den bereits zu Versuchsbeginn geringen Th-Mengen noch aktives Enzym vorhanden war, ist sehr unwahrscheinlich.

### Zusammenfassung

Es wurde ein kurzer Überblick über die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften von Fibrinogen und Thrombin bzw. Fibrin gegeben.

Unsere Erfahrungen mit diesen Substanzen haben wir aufgezeichnet und die Probleme der Polymerisation und Repolymerisation in Angriff genommen.

Eine Polymeraseaktivität des Thrombin erscheint uns sehr zweifelhaft.

## II. Tierexperimente

In den Tierversuchen sollten zunächst möglichst spezifische Antikörper gegen Fibrinabbauprodukte gewonnen werden.

Da bekanntlich die Bildung von Immunglobulinen durch höhermolekulare, parenteral verabreichte Substanzen, die für den Wirt fremd sind, stimuliert wird, war zu erwarten, daß Kaninchen gegen Rinder-Solufibrin Antikörper bilden. Die Frage, ob sich mit harnstoffgelöstem Fibrin Antikörper von höherer Spezifität gewinnen ließen als mit dem immer noch mit 4 % ungerinnbaren Proteinen behafteten Fibrinogen, sollte untersucht werden.

Ob es dabei der möglichen Resynthese der Fibrinmonomeren wegen in bestimmten Organen durch Thrombosierung von Gefäßen zu pathologischen Veränderungen kommen würde, die als Modell einer "intravitalen Fibrination (13)" gelten konnten, sollte durch "klinische Beobachtung", vor allem aber durch die Sektion der getöteten Tiere festgestellt werden.

### Die Injektion

Über das Injektionsmittel Solufibrin wurde im Teil I ausführlich berichtet. Einige Dinge sollen jedoch noch besonders erwähnt werden.

Daß das verwendete Lösungsmittel Harnstoff in den zur Injektion kommenden Mengen außer gelegentlichen Diuresen, vereinzelt Hämolysen und Verkürzung der Nativ-Lysiszeit keinen Einfluß nimmt, besonders nicht in dem von Fongi (21) beschriebenen Ausmaß, war von R. Marx und von S. Kutzinsky bereits untersucht worden (59a).

Zur intravenösen Injektion wurden nur umgefällte Solu-Präparate verwendet, die mindestens 5 Stunden alt waren bzw., aus der Tiefkühltruhe genommen, erst aufgetaut werden mussten.

Daß die Präparate nicht jeden Tag frisch bereitet wurden, hat seinen Grund in der ziemlich langen Arbeitszeit von rund 10 Stunden, welche die wiederholte Umfällung und Auflösung beansprucht. Es waren aber alle Präparate noch repolymerisierbar mit Ausnahme des sog. Trypure Solu. Einmal passierte es uns, daß sich bei der 5. Umfällung die Fibrin-Flocken beim Versuch, sie wie gewöhnlich aufzudrehen, in lauter kleine Krümelchen zerteilten. Es blieb nichts anderes übrig, wollten wir das Präparat nicht verwerfen, als das Wasser abzufiltrieren.

Leider wollte sich das Fibrin - sei es durch den Kontakt mit dem Ca-haltigen Filter oder sonstiger Verunreinigung - im Harnstoff nicht mehr lösen.

Nach Vortesten mit niederen Dosen wurden pro ccm "Fibrin<sub>5</sub>" 125 WE

Trypure zugegeben und die Ansätze in den Brutschrank (37° C) gestellt.

Nach 60 Min. war alles gelöst; die A. dest. -Probe fiel negativ aus. Mit 5-facher Menge Aceton kam es zur Trübung. Wie die übrigen Solu-Präparate wurde das mit Hilfe von Trypure hergestellte in Einzeldosen von 5 bzw. 2,5 ccm abgefüllt und eingefroren.

Um ein Weiterwirken des Trypure zu verhindern, wurden vor der Injektion pro ccm Solu 120 E Trasylol zugesetzt.

Den Vorversuchen zufolge (59), welche auf eine bessere Verträglichkeit des mit Citratblut inkubierten Solus hindeuteten, wurde dem Versuchstier eine entsprechende Citratblutmenge entnommen und im Verhältnis 1:1 mit Solu gemischt. Damit konnten etwa vorhandene Spuren von Thrombin sicher ausgeschaltet werden (vergl. S. 55).

Dieses Gemisch blieb dann 55 Min. im Zimmer stehen; die letzten 5 Min. vor der Injektion wurde es mit der Spritze bei 37° C gehalten, um die Temperatur in etwa der des Tierkörpers anzugleichen.

Mit dieser "Verdünnung" haben wir gerade die für das in Lösung-Bleiben der Fibrin-Monomeren notwendige Harnstoff-Konzentration von m 2,35 (14) unterschritten, so daß es zumindest zur Ausbildung von Intermediärpolymerisaten kommen musste.

Eine Mikrogerinnung - auch wenn wir nicht wie in dem auf S. 58 beschriebenen Fall Fibrin-Flocken sehen konnten - muß also angenommen werden.

Alle Tiere mit Ausnahme von Kan. XIX haben die "Fibrinbeschauerung" (R. Marx) überlebt, sei es daß die verhältnismäßig kleinen Thromben<sup>†</sup> (s. S. 36) sie nicht zu sehr schädigten, oder aber, daß sie das Fibrin sehr rasch abbauten.

Zur subcutanen Injektion wurde Solu<sub>1</sub> nicht inkubiert verwendet.

Zum Vergleich wurde in zwei Fällen Fibrinogen (1 %) appliziert.

Hierbei muß erwähnt werden, daß obwohl alle Präparate unter keineswegs sterilen Bedingungen hergestellt wurden, die auf einem glucosehaltigen Nähragar ausgestrichenen Solu-Präparate kein Bakterienwachstum aufwiesen, während die Fibrinogen-Lösungen einen "Staphylokokken-Rasen" wachsen ließen.

Die Sterilität der Solu-Lösungen dürfte auf der altbekannten Desinfektionswirkung des Harnstoffes beruhen (63).

Die Injektionsmenge richtete sich nach der Größe des Tieres.

Kaninchen zwischen 4 und 5 kg Gewicht erhielten pro Injektion 5 ccm Solu-fibrin, während die jungen Tiere (2,5-3 kg) 3 ccm erhielten. Dies entspricht

---

+ ) Unter der Wirkung der Herzbewegung könnte es zu einer raschen Zerteilung des Fibrins kommen (vergl. S. 36).

bei einem Fibringehalt von ca. 4 mg/ccm einer Gabe von 4 mg/kg Körpergewicht oder 0,1 mg/ccm Blut.

Nur in Ausnahmefällen wurden höhere Dosen verwendet. Das Höchste, was einem Tier insgesamt appliziert wurde, waren 250 mg Fibrin bzw. 360 mg Fibrinogen, das Mindeste 8 mg Fibrin bzw. 10 mg Fibrinogen.

Von den vielen Möglichkeiten der Injektion wurde in unseren Versuchen größtenteils die intravenöse Verabfolgung benutzt. Hierbei war es möglich, eine verhältnismäßig große Dosis zu geben und eine rasche Verbreitung entweder im ganzen Organismus zu bewerkstelligen oder aber eine Anhäufung in bestimmten Organen herbeizuführen.

Eine Normung der Applikationsart ist erforderlich, da Änderungen derselben zu verschiedenartigen Reaktionen Anlaß geben könnten (36).

Es wurde verhältnismäßig rasch injiziert: Im Durchschnitt gelangten pro Minute 5 ccm des Injektionsgemisches in die Blutbahn.

In seltenen Fällen wurde subcutan bzw. i. m. injiziert - entweder am Ohr oder in der Glutealgegend.

Einmal passierte es uns, daß wir eine intracutane Solu-Quaddel setzten. Dabei löste sich die Epidermis ab und es entstand ein Hautdefekt.

Die Zahl der direkt oder in Abständen nacheinander erfolgenden Injektionen war zielabhängig.

Ging es darum, einen möglichst hohen Antikörpertiter zu erzeugen, so wurde über 5-7 Tage täglich injiziert, um dann nach einem Intervall von mindestens 6 und höchstens 28 Tagen - also der Zeit, da Sensibilisierung erwartet werden konnte - Reinjektionen folgen zu lassen. Dies gilt für Tier I, III, V, VIII, X, XI und XII.

Sollte jedoch nur etwas über den Verbleib und die allgemeine Wirkung des Solufibrins ausgesagt werden, so wurde meist nur einmal massiv oder in rascher Folge ohne größere Intervalle als 24 Stunden injiziert und dann Blut entnommen (siehe Teil III) - Tier VII, X, XI, XVII, XVIII, XIX - oder das Tier wurde getötet und untersucht (II, IV, VI, IX, XIII, XIV, XV; schließlich fast alle Tiere).

## Die immunologische Reaktion

Nach Hektoen (36) ist die Artspezifität von Fibrinogen gering. Der Unterschied zwischen Rinder- und Kaninchenfibrin jedoch ist so groß, daß ersteres im Kaninchen als Antigen wirksam wird.

Zunächst soll vom eigentlichen Ziel der Tierexperimente, der Antikörperbildung die Rede sein.

Als Antikörper gilt nach Doerr "jede Substanz, welche im Blutserum oder in den Körpersäften eines Tieres als Antwort auf den Reiz auftritt, den die parenterale Einführung eines Antigens in die Gewebe ausübt, und die mit diesem Antigen spezifisch in irgendeiner der Beobachtung zugänglichen Art reagiert" (9 vol I).

Die Definition von Kallós (38): "Antikörper sind durch die spezifische Struktur des Antigens modifizierte Serunglobuline" sagt bereits etwas über die Bildungsweise aus - wohl in dem Sinne der von Pauling (nach 36) aufgestellten Hypothese, daß sich die Polypeptidkette am Antigen wie an einer Matrize falte, so daß ihre Gestalt sehr genau der Oberfläche desselben angepaßt sei. (Ehrlich: "--- wie der Schlüssel in das Schloß").

Isliker (36) will jedoch die Determination des Antikörpers nicht unbedingt auf den Faltungsprozeß festlegen. Er sagt, daß das Antigen sich an irgendeinem Punkt der Biosynthese einmische, mit dem Ergebnis, daß Globuline entstehen, deren Moleküle komplementär der determinanten Gruppe des Antigens angepaßt sind.

Da diese "determinanten" Gruppen in verwandten Antigenen vorkommen oder auch getrennt vom Protein als Haptene - ein Präcipitin von nicht antigenem Charakter - erscheinen können, ist die Spezifität eines Antikörpers eine relative. Die physikochemischen Untersuchungen von Antikörpern haben ergeben, daß es sich dabei um  $\gamma$ -Globuline handelt mit einem Molekulargewicht von ca. 150 000 und der Form von länglichen Ellipsoiden ( $240 \times 44^0$ ).

In ihrer Zusammensetzung zeigen sie keine großen Unterschiede zu anderen Proteinen; die Besonderheit liegt in der Aminosäure-Sequenz. Nur etwa 3 % der gesamten Oberfläche des Moleküls - bestehend aus mehr als einer und weniger als zehn Aminosäuren - erscheinen für die Antigen-Antikörperreaktion (AAR) von Bedeutung.

Interessant ist, daß sich bei von Kaninchen gebildeten Ak als N-terminale Gruppe Alanin zeigte, während bei anderen Tierarten Alanyl gefunden wurde (36).

Woraus und wie auch immer<sup>+</sup> Antikörper entstehen, als ihr Entstehungsort darf das Retikulo-Endotheliale System angenommen werden (5; 9 vol I; 28; 31; 33; 39:). Das bedeutet, daß die Bildung der Immunglobuline in den Retikulumzellen und Sinusepithelien von Milz, Lymphknoten und Knochenmark, in den von Kupfferschen Sternzellen der Leber, schließlich in den Endothelien und Uferzellen aller Gefäße sowie in den Histiozyten (Monocyten) abläuft.

---

<sup>+</sup>) de novo (Green u. Anker, nach 36), aus vorgeformtem Material (Pauling, nach 36, 48) oder durch Umwandlung inaktiver  $\mu$ -Globuline (Askonas, nach 36).

Wie Haurowitz (32) mit radioaktiv markierten Antigenen zeigen konnte, erfolgt deren Ablagerung vorwiegend in den genannten Organen; dazu in der Lunge.

Es muß angenommen werden, daß das Antigen an die Zelle adsorbiert oder in Form von Abbau-Fragmenten an bestimmte Gewebeproteine - nach Graveyn und Campell an die Ribonucleinsäure - in der Zelle gebunden ist. Ob das Ag auf dem Wege der Pinocytose in die Zelle gelangt, ist noch nicht geklärt (85i).

Das Schicksal des parenteral zugeführten Antigens wäre also folgendes: Nach der ersten Injektion zirkuliert das Fremdprotein, vorausgesetzt daß es löslich ist, längere Zeit im Blut, z. T. wird es durch die Niere ausgeschieden, z. T. langsam (- es ist bekannt, daß nur denaturierte, nicht aber native Proteine von den Enzymen angegriffen werden -) in den Körperzellen abgebaut.

Wenige Antigen-Moleküle dringen in die zur Antikörperbildung befähigte Zelle<sup>+)</sup>  ein, was die minimale und langsame Antikörperbildung der Primärreaktion erklärt.

Trifft jedoch das Antigen bei der Reinjektion auf Antikörper, so bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe, welche von den Zellen des RES phagozytiert, rasch und in großen Mengen in das Innere der Zelle gelangen und zu einer intensiven Antikörperbildung Anlaß geben.

Dabei kommt es nicht selten, bei Meerschweinchen so gut wie immer (9, 38), aber auch beim Kaninchen zur Ausbildung eines anaphylaktischen Schocks, der akut oder protrahiert zum Tode führt.

Die von Doerr (9 vol VI) sehr allgemein gehaltene Aussage, der anaphylaktische Schock sei eine in den Organismus verlegte AA-Reaktion, wobei der Organismus die Rolle eines Indikators des Reaktionsgeschehens übernimmt, ist der Histamin- und Acetylcholin-Hypothese, wonach die Freisetzung dieser Substanzen für das Schockgeschehen verantwortlich ist, vorzuziehen.

Die Vereinigung von Antigen und Antikörper auf der Zellmembran (38) führt zur Depolymerisierung, also zu einem Reiz, auf welchen die Zelle in der ihr eigenen Weise reagiert, z. B. die Muskelzelle mit Kontraktion.

Dies also wäre die Ursache für Bronchospasmus beim Meerschweinchen, Lungenperre (= Gefäßkrampf) beim Kaninchen und Lebersperre beim Hund (9 vol VI).

---

+) Die neueste Lehrmeinung (München 1963) billigt nur den Plasmazellen und deren Vorstufen die Fähigkeit der Ak-Bildung zu; auch die Lymphozyten sollen die Ak-Bildung beeinflussen.

### Beobachtungen an unseren Tieren:

Daß keines von den 6 Ak-bildenden Tieren, welche auf Grund der Reinjektionen im anaphylaktischen Zustand insgesamt 10 mal Gelegenheit dazu hatten, in einen massiven anaphylaktischen Schock geriet, hat seinen Grund in der bereits angedeuteten Vorbehandlung unseres Antigens:

Die Inkubation des Solu-Fibrins (= Antigen) mit dem im anaphylaktischen Zustand mehr oder weniger antikörperhaltigen Blut hatte zur Folge, daß die AA-Reaktion in vitro ablief. Da nicht erwartet werden darf, daß Antigen und Antikörper sich genau aufheben, wäre immerhin - bei der Annahme eines Überwiegens des Antigens - eine Verdünnung erreicht, welche einer speziellen Form der intravenösen Desensibilisierung gleichkommt (9 vol IV; 39).

Auf jeden Fall bekam das Tier auch fertige AA-Komplexe injiziert, welche der Membranhypothese nach keinen Reiz auf die Zellen mehr ausüben; sie werden vielmehr rasch von den Zellen des RES phagozytiert, was die Antikörperbildung beschleunigt. So ist es erklärlich, daß schon 6-8 Tage nach der Reinjektion relativ hohe Ak-Titer auftraten.

Besonderer Erwähnung bedarf die Tatsache, daß Tier XII bei der massiven intravenösen Trypsin-Dosis (600 E pro Injektion, also insgesamt 4 000 E) keinen Schock bekam.

Wie schon erwähnt, wurde versucht mittels Trasylol die Trypure-Wirkung zu hemmen. Dies scheint gelungen zu sein, da nach Forell (85h) Trypsin intravenös gegeben durch Kallikreinaktivierung leicht einen Schock herbeiführen kann. Ungeklärt bleibt aber dann die pathologisch-anatomische Veränderung des Herzmuskels (s. S. 87 ).

In einigen Fällen hatten wir den Eindruck einer "anaphylaktoiden" (Doerr) Reaktion. Die Tiere hatten kalte Ohren, Atemnot, waren unruhig und die Schnauze war feucht. Dies war aber immer zu einem Zeitpunkt der Fall, da ein Vorhandensein von Antikörpern im Blut fast unmöglich war:

| Tier: | I nach der 7. Injektion der I. Reihe |   |   |    |         |
|-------|--------------------------------------|---|---|----|---------|
| "     | III                                  | " | " | 6. | " " " " |
| "     | IV                                   | " | " | 3. | " " " " |
| "     | XIV                                  | " | " | 1. | "       |
| "     | XVI                                  | " | " | 1. | "       |
| "     | XVII                                 | " | " | 1. | "       |
| "     | XVIII                                | " | " | 1. | "       |
| "     | XIX                                  | " | " | 1  | "       |

Wie wir rückschauend feststellen müssen, handelte es sich dabei um eine Reaktion auf das Injektionsmittel in seiner Eigenschaft als ein in größeren Flok-

ken resynthetisierbares Fibrin (Mikrofibrination bzw. Mikroembolisierung).

Während, wie schon berichtet, das Solu-Fibrin sonst immer gealtert aus der Tiefkühltruhe verwendet wurde - (kleinere Repolymerisate) -, war es zu diesen Injektionen frisch hergestellt worden.

Ganz aus dem Rahmen fällt der plötzliche Tod des zuletzt injizierten Tieres XIX, welches sowohl dem klinischen Bild nach als auch dem Sektionsbefund zufolge an multiplen Lungenembolien starb (s. S. 89).

Die fehlende Reaktion bei Tier XIII und VI, welche ebenfalls mit frischem Solu gespritzt wurden, kann nicht gewertet werden, da die Zeit bis zur Injektion von Evipan zu kurz war, um die Ausbildung der Symptome zu beobachten.

Nicht zu erklären ist dagegen das Ausbleiben einer anaphyl. Reaktion bei den Parallelversuchen mit Fibrinogen. Letzteres wurde nämlich nicht inkubiert als reine NaCl-Lösung gespritzt. Tier V und X hatten 3 mal Gelegenheit zu kollabieren und taten es nicht. Die Zahl der Versuche ist jedoch zu klein, um daraus Rückschlüsse ziehen zu können (s. S. 81; 85). In zwei Fällen (Tier VIII und XI) wurde eine lokale Anaphylaxie im Sinne des Arthus-Phänomens ausgelöst (s. S. 84).

Der Versuch bei Tier XV, lokale Anaphylaxie durch passive Immunisierung zu erzeugen (Prausnitz-Küstner Versuch nach der Abwandlung von Fischel und Kavatz, kombiniert mit einer Trypanblau-Injektion, wie sie Ramsdell vorschlägt, nach 92), war nicht eindeutig erfolgreich.

Zwar erschienen Ödem und Rötung im Bereich der Antigen-Antikörper-Injektion stärker, die Ansammlung des intravenös applizierten Trypans jedoch war eindeutig im Bereich der reinen Solu- bzw. Fibrinogen-Injektion am stärksten (Fibrinogen als "Fliegenleim").

Neben den gerade beschriebenen Versuchen in vivo wurde der Nachweis dafür, daß die genannten Tiere wirklich Antikörper erzeugt haben, für 7 Sera von den Behringwerken (Marburg) auf dem Wege der immunoelektrophoretischen Untersuchung (s. S. 110) erbracht. Diese und alle übrigen entnommenen Sera - es waren ca. 40 - wurden von uns mittels Geldiffusion nach Ouchterlony (s. S. 10) untersucht.

Darnach enthielten folgende Sera Antikörper gegen Rinderfgen bzw. -fibrinmonomeren:

|               |   |                                                   |     |   |
|---------------|---|---------------------------------------------------|-----|---|
| Kaninchen I   | : | 5 Tg. post reinjectionem <sub>1</sub>             |     |   |
| Kaninchen III | : | 7 (28) Tg. post reinjectionem <sub>1</sub>        |     |   |
|               |   | 6; 10; 14; 25 Tg. post reinjectionem <sub>2</sub> |     |   |
|               |   | 5; 13; 21 Tg.                                     | " " | 3 |
|               |   | 5; 10; 20 Tg.                                     | " " | 4 |
|               |   | 6; 13 Tg.                                         | " " | 5 |

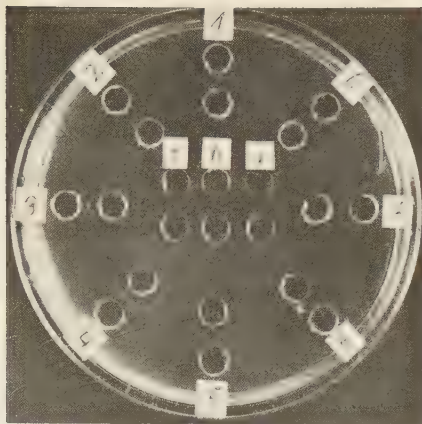
|                 |                                  |   |
|-----------------|----------------------------------|---|
| Kaninchen V :   | 8; 12; 21 Tg. post reinjectionem | 1 |
|                 | 5; 10; 19 Tg. "                  | 2 |
|                 | 6; 13 Tg. "                      | 3 |
| Kaninchen VIII: | 5; 10; 19 Tg. "                  | 1 |
| Kaninchen X :   | 6; 9 Tg. "                       | 2 |
| Kaninchen XI :  | 6 Tg. "                          | " |
|                 | 13 Tg. "                         | 1 |
|                 | 6; 9 Tg. "                       | 2 |

Geldiffusion von Rinderfgen (1 %) gegen:

|                     |                            |    |   |
|---------------------|----------------------------|----|---|
| 1 Serum v. Kan. III | (7 Tg. post reinjectionem) | 1) | + |
| 2 " " "             | (28 " " "                  | 1) | - |
| 3 " " "             | (6 " " "                   | 2) | + |
| 4 " " "             | (10 " " "                  | 2) | - |
| 5 " " "             | (14 " " "                  | 2) | + |
| 6 " " "             | (25 " " "                  | 2) | + |
| 7 " " "             | (5 " " "                   | 3) | + |
| 0 " " "             | ante Injectionem           |    | - |

Die Zahl und Stärke der Präzipitationslinien waren verschieden. Während für die Zahl und die Schärfe der ausfallenden Linien ein heterologes Antigen (z. B. Solufibrin mit drei verschiedenen Sedimentationskonstanten ergab drei Linien) bzw. ein Überschuß von Antigen oder Antikörper verantwortlich ist (84), ist die Stärke der Ausfällung bei konstanter Antigenkonzentration vom Ak-Gehalt des eingesetzten Serums abhängig. Somit ist die Intensität ein Maß für den Ak-Gehalt.

Über Untersuchungen mit Ak-Sera wird im Teil III der Arbeit berichtet.



## Die pathologisch-anatomischen Veränderungen

Was geschieht im pathologisch-anatomischen Sinne mit einem Tier, das mehr oder weniger intensiv mit Fremdeiweiß parenteral in Berührung kommt, und was für Veränderungen treten speziell im Falle einer länger oder kürzer dauernden parenteralen Zufuhr von Fibrin in gelöstem Zustand bei unseren Kaninchen auf?

Nach Rössle (n. 6) entsteht auf einen allergischen Reiz hin "eine qualitativ gewöhnliche nur quantitativ ungewöhnliche Entzündung". Das bedeutet jedoch nicht, daß jede allergische Reaktion notwendig mit einer Entzündung einhergeht (62).

Die Antigen-Antikörperreaktion läuft selbstverständlich im ganzen Organismus ab, doch treten pathol. anat. Veränderungen vornehmlich am Sitz der Antikörper auf, wobei die Zuführungsart, vor allem aber die "Ausgangssituation" der einzelnen Organe von Bedeutung ist (38).

Ein minder durchblutetes (38) oder relativ überbelastetes (38; 62) Organ zeigt meist stärkere allergische Veränderungen als die übrigen.

Wie aus der Klinik der Allergosen (23) bekannt ist, sind Erkrankungen des Respirationstraktus (Asthma), des Herzens (Myocarditis) und der Gefäße (Periarteriitis nodosa), der Niere (Glomerulonephritis), aber auch des Darms (Colitis mucosa), des Zentralnervensystems (Migräne), der Haut (Kontaktdermatitis) und nicht zuletzt der Gelenke (Rheuma) häufig allergisch bedingt.

Die Pathologie dieser Organe ist es auch, die in den in der Literatur beschriebenen Experimenten besonders eingehend untersucht wurde (62).

Es soll hier zunächst das pathol. anat. Substrat der allergischen Hautreaktion, wie sie das Arthus-Phänomen darstellt, wiedergegeben werden.

Die Reaktionskomponenten sind: Exsudation, Gewebsverquellung, Gefäßwandveränderungen im Sinne einer Verdickung, dadurch mitbedingte Störung der Blutströmung (Fröhlich nach 62) (Iijimann nach 6), Zellinfiltration und Nekrose (Gerlach nach 62). Als eine Besonderheit mag die Beteiligung der eosinophilen Zellen gelten (Schlecht und Schwenker, Rössle nach 62). Die Heftigkeit der allergischen Hautreaktion ist nicht nur vom Tier und der Zeit zwischen Injektion und Beobachtung abhängig, sondern wechselt auch mit der Körperstelle (6). Schon bei einer oberflächlichen makroskopischen Betrachtung sehen wir dabei Hautblutungen und eine gewisse Starre des Gewebes.

Während es nach der Erstinjektion nur zur Rötung kommt, und die Resorption rasch vor sich geht, treten als anamnestiche Reaktionen die oben beschriebenen Veränderungen auf.

Bei der allgemeinen allergischen Reaktion stehen Veränderungen des RES und damit der Milz, Leber und des Knochenmarks im Vordergrund.

Von Bedeutung ist dabei das Festhaften des Antigens an den Endothelien. Diese können bei sensibilisierten Tieren wuchern oder zerstört werden. Dabei wird Fibrin abgesondert; dieser "Fibrin-Endotheltrombus" wird organisiert, wodurch das Granulom der Intima entsteht (5).

Somit wäre das Granulom oder eine Restnarbe das Substrat einer erfolgreichen allergischen Antigenfixierung und -bekämpfung (62).

Das Auftreten von knötchenförmigen Proliferaten wird (Apitz nach 62) auch nach einmaliger Antigenzufuhr beschrieben.

Intimagranulome bei sensibilisierten Tieren kommen nicht nur in der Leber, der Milz und im Knochenmark vor, sie werden auch in der Lunge beschrieben, obwohl die Endothelien dieses Organs nicht sehr aktiv sind in der Farbstoffspeicherung, einer Eigenheit des RES.

Veränderungen, wie etwa die pericapillären Ansammlungen von Leukozyten in der Lunge, als allergisches Phänomen zu deuten, ist nicht zulässig, da sie auch bei normalen Tieren vorkommen.

Bei direkter Antigenzufuhr (Verspraying des Antigens in der Einatmungsluft) oder bei spezifischer Belastung des kleinen Kreislaufs kommt es beim sensibilisierten Tier in der Lunge zu heftigen "allergischen" Erscheinungen, wie Verdickung der Septen - was eine Atelektase vortäuschen kann -, Bildung von "Fibrinknötchen" und einer Überfülle von Leukozyten in den Ge-

fäßen, während Leber und Milz kaum Reaktionen zeigen.

Die Lokalisation von Veränderungen allergischer Genese im Herzen in Form einer Myocarditis, in der Aorta als Mediasklerose und in der Niere unter dem Bild einer interstitiellen Nephritis von exsudativ-lymphozytärem Charakter ließ sich nach Pagel (62) nur durch bestimmte Eingriffe (Belastung des Kreislaufs durch Coffein oder "Entnervung" z. B. der Niere) erzielen.

Im Falle der Anwendung von Solufibrin als Antigen ist, wie bereits erwähnt (s. S. 66), die Repolymerisation, also die Möglichkeit einer intravitalen Gerinnselbildung, zu beachten.

Je nach der Größe und Zahl sowie dem Entstehungsort der Gerinnsel kann es zu sehr kleinen Gefäßverschlüssen kommen, die weder klinisch noch licht-mikroskopisch erfaßbare Veränderungen hervorrufen, oder aber es kommt zu massiven Thrombo-Embolien.

Der Ort des Verschlusses - abhängig von der Repolymerisationsgeschwindigkeit - ist ausschlaggebend für den resultierenden Kreislaufschaden mit seinen Folgen.

Da die RP-Zeit abhängig ist vom Verdünnungsgrad, vom Verdünnungsmedium und der Durchmischung, ist der Thrombose-Ort individuell verschieden.

Es könnte zu Lungenembolien mit ihrer sekundären Wirkung auf das rechte Herz kommen, zu coronaren Verschlüssen - also Herzinfarkten -, aber auch zur Gehirn-, Nieren- oder Milzapoplexie.

Ob die Veränderungen frisch als Embolien oder die resultierenden Parenchymnekrosen oder Narben im betroffenen Organ zu Tage treten, hängt vom Intervall zwischen der letzten Injektion und dem Zeitpunkt des Todes ab.

Als allgemeine Folge der gesetzten Durchblutungsstörung konnte es auch zum Kollaps mit seinen Folgen kommen (s. S. 71).

Daneben ist zu bedenken, daß es bei einem sehr raschen Abbau der Gerinnsel (77) zu einer restitutio ad integrum kommen könnte und somit keinerlei pathol. -histol. Befund erhoben werden konnte.

Nach diesen allgemeinen Vorbemerkungen über mögliche pathol. anatom. Veränderungen sollen die Befunde der einzelnen Tiere aus unseren Versuchen aufgeführt werden.

Als zur Gruppe A gehörig werden alle Tiere bezeichnet, die erwiesenermaßen Ak gebildet haben; zur Gruppe B zählen jene, in deren Serum keine Ak nachweisbar waren.

Die histologischen Untersuchungen wurden dankenswerterweise von Herrn Priv. Doz. Dr. A. Georgii durchgeführt.

Sektionsbefunde der mit Solufibrin<sup>+</sup>) injizierten Kaninchen  
Kaninchen I<sup>++</sup>) (7) A

1. Injektionsserie: 13. XII. 1961 - 19. XII. 1961  
7 Injektionen = 150 mg Fibrin (Solu<sub>6</sub> Nr. 588)
2. Injektionsserie: 16. I. 1962 - 19. I. 1962  
3 Injektionen = 60 mg Fibrin
- Tötung 6 Tg. post inj. 25. I. 1962 250 mg Evipan + 20 ccm Luft i. v.  
Sektion: ca. 30 ccm Ascites-Flüssigkeit, sonst keine pathol. Befunde.

Histologische Präparate:

- Myocard: Ausgedehnte interstitielle Fibrose, flächenhafte Verschielungen zwischen den wenigen erhaltenen atrophischen Muskelfasern. Häufig kleine Rundzellinfiltrate im Bereich frischer Muskelnekrosen. Keine Gefäßveränderungen; keine Thrombosen.  
Diagnose: Frischere dissiminierte Herzmuskelnekrosen, ältere Verschielungen.
- Niere: Etwas vermehrt fädiges bis wolkiges Eiweiß in den mäßig erweiterten Tubulus-Lichtungen. Tropfenförmige Auflagerungen auf den Epithelien, sowie vereinzelt Vakuolisierung der Tubulusepithelien. An den Glomerula keine Veränderung.  
Diagnose: Geringe Eiweißnephrose.

Lunge, Milz, Nebenniere, Aorta: Keine bemerkenswerten pathol. Veränderungen.

Kaninchen II (8) B

- Injektionen: 26. I. 1962 - 31. I. 1962  
6 Injektionen = 130 mg Fibrin (Solu<sub>6</sub> Nr. 625)
- Tötung: 1. II. 1962 200 mg Evipan; Tod durch Schlag ins Genick.

---

+) In 2 Fällen kam Fgen zur Injektion

++) röm. Zahlen: Tiere aus Versuchen von M. Weinzierl  
arab. Zahlen: Fortlaufende Nummern der von Dr. Georgii untersuchten Kaninchen.

Sektion: Abdomen: Coccidioseartige Zysten d. Mesenteriums.  
 Leber: Narben  
 Milz: gr. Lymphfollikel  
 Niere: 1. erbsgroßer dunkler Fleck  
 Nebenniere: o. pathol. B.  
 Ovarien: stecknadelkopfgroße Cysten und punktförmige Blutungen.  
 Magen und Darm: o. path. B.  
 Thorax:  
 Cor: Am Ansatz der Mitralklappe weißliche Einlagerungen.  
 Im re. Vorhof doppelgestielter Thrombus v. 1,5 mm Durchmesser.  
 Sonst keine path. Befunde.

#### Histologische Präparate:

Myocard: Überaus schwere leuko-lymphozytäre Infiltrierung des gesamten Präparates. Hochgradige Erweiterung der Muskelinterstitien. Ausgedehnte frische fleckförmige Nekrosen. Hochgradige Atrophie der Herzmuskelfasern. Keine Veränderung der peripheren Coronarien, keine Thrombose.  
Diagnose: Schwerste subakute, eitrige Myocarditis mit Herzmuskelnekrosen.

Lunge: Mehrere kleinste Lymphoreticuläre Knötchen des Lungengerüstes mit fibrinoiden Thrombosen des Gefäßlumens an einer Stelle (mark.). An den übrigen Knötchen keine sicheren Thrombosen nachweisbar. Befund wesentlich geringer als bei Tier 3.  
Diagnose: Multiple Granulome, bei fibrinoiden Kapillarthrombosen.

Niere: (2 Stellen) Befund ähnlich wie bei Tier I (7)  
Diagnose: Leichte Eiweißnephrose.

Cysten- wand: Hyalinisiertes Lumen einer Cystenwand mit reichlicher Tropfenbildung im umgebenden lockeren Mesenchym. Die Tropfen für Coccidien wohl zu groß. Inhalt kaum erkennbar.

Milz: Keine wesentlichen pathol. Veränderungen.

### Kaninchen III (9) A

1. Injektionsserie: 2. II. 1962 - 8. II. 1962 - 7 Injektionen

Reinjektion<sub>1</sub> nach 20 Tagen

Reinjektion<sub>2</sub> " 34

Reinjektion<sub>3</sub> " 26

Reinjektion<sub>4</sub> " 19 "

Reinjektion<sub>5</sub> " 20

Solu<sub>6</sub> = 260 mg Fibrin (Nr. 628)

Tötung am 24. VII. - 13 Tage nach der letzten Injektion 800 mg Evipan.

Sektion: Niere: Kapselgefäße deutlich vermehrt injiziert.  
Die Kapsel sitzt fester auf dem Organ als gewöhnlich.  
Herz: etwas vergrößert, bes. der re. Ventrikel; Adipositas  
auch des Herzbeutels.  
Aorta: ein rauhes Beet.  
Lunge: emphysematös "himmbeerfarben" mit erhabenen weiß-  
lichen Feldern.

#### Histologische Präparate:

Myocard: (4 Stellen) In allen Schnitten finden sich neben älteren, größeren, zellarmen, bindegewebsreichen Schwielenbezirken auch frische Veränderungen. Dabei handelt es sich einmal um ganz frische einzelne Fasern betreffende Nekrosen mit Blutungen, zum andern um eben solche frische Nekrosen mit kleinen lympho-histiozytären Zellinfiltrationen.

Diagnose: Ältere Verschwielungen, frischere dissiminierende Nekrosen.

Lunge: Herdförmig verbreitetes Lungengerüst mit starker Hyperämie, aber wohl auch leukozyt. und histiozyt. Zellinfiltrierung. Ausgedehnte Knötchen aus Reticulumzellen, keine Fibrinablagerung nachweisbar.

Diagnose: Kleinste interstitielle Granulome (Stallinfekt?). Keine Fibrinthromben.

Leber: Normale Organstruktur mit leichter leukozytärer-lymphozytärer und reticulozellulärer Infiltration der Glissonfelder. Keine Fibrinablagerung.

Diagnose: Chron. intrahepat. Cholangitis (Stallinfekt?)

- Milz: Im gehörig aufgebauten Organ eine sehr dichte leukozytäre Durchsetzung der roten Pulpa mit Untermischung durch zahlreiche Eosinophile. Dieser Befund entspricht noch der Norm.  
Diagnose: keine wesentlichen pathol. Veränderungen.
- Niere: Im Markbereich finden sich im Lumen der Schleifen teils Zelldetritus aus mehreren nekrot. Zellen, teils auch Riesenzellen des Tubulusepithels, sowie etwas homogenes Eiweiß. In den Hauptstücken der Rinde eine stellenweise erhebliche Plasmavakuolisierung, eine Epithelschwellung, Untergang einzelner Epithelien und fädiges Eiweiß in den Lichtungen. Im Interstitium zwischen den geraden Harnkanälen eine homogene Verquellung oder Eiweißablagerung. An den Glomerula und den Arteriolen keine Veränderungen.  
Diagnose: Epithelschäden im Sinne einer nicht mehr ganz frischen mit Nekrosen einhergehenden Nephrose.

#### Kaninchen IV (10) B

Das Tier hatte Otitis media und wurde mit Reverin behandelt, leider ohne Erfolg.

Injektionen: 7. III. 1962 - 9. III. 1962 - 3 Injektionen = 70 mg Fibrin  
(Solu<sub>6</sub> Nr. 628)

Tötung: 9. III. 1962 - 30 Min. nach der letzten Solu-Injektion  
250 mg Evipan.

Sektion: Thorax::

Lunge: Drei hellrote, landkartenförmige Flecken von ca. 5 mm Durchmesser.

Herz: Bi- und Trikuspidalklappe glasig verdickt.

Aorta: rauhes Beut von ca. 2 mm Durchmesser in der A. ascendens.

Abdomen: makroskop. kein path. Befund.

Histologische Präparate:

Myocard: Keine sichere path. Veränderung.

Lunge: (3 Stellen) Auch hier eine teilweise erhebliche Gerüstverdickung durch lympho-reticuläre, leukozytär durchsetzte Knötchen. Keine Thromben nachweisbar.  
Diagnose: Kleinste knötchenförmige Proliferate im Lungen-gerüst.

Niere: Geringe Eiweißnephrose.

Cyste: Hyalinisierte Cystenwand ohne weitere Veränderungen.

Leber: Milz, Nebenniere, Ovar, Schilddrüse, Aorta, Muskulatur, Rippe mit Knochenmark; ohne bemerkenswerten path. Befund.

Kaninchen V (11) A (s. S. 72)

1. Injektionsserie: 4. V. - 10. V. - 6 Injektionen von Fibrinogen

Reinjektion<sub>1</sub> nach 15 Tagen

Reinjektion<sub>2</sub> " 29 "

Reinjektion<sub>3</sub> " 19 "

Insgesamt 360 mg Fibrinogen (Nr. 628)

Tötung: 24. VII. 1962 - 13 Tage nach der letzten Injektion - 600 mg Evipan.

Sektion: Abdomen: Cystische Veränderungen (Parasit)

Leber: narbig segmentiert

Milz: bläuliche Flecken

Herz: Adipositas; Mitralis glasig verdickt,  
Tricuspidalis zeigt fibrinöse Auflagerung.

Lunge: 1 frischer hämorrh. Infarkt, einige bläuliche Flecken.

Histologische Präparate:

Myocard: Keine wesentl. path. Veränderungen.

Lunge: Ähnlich wie bei Tier III (9) ungleichmäßig verdicktes Lungen-  
gerüst und angedeutete Knötchen. Enorme interstitielle und  
alveoläre Blutung, teils mit Ödemaustritt (agonal bedingt).  
Diagnose: Keine wesentl. path. Veränderungen.

Leber: Herdförmig vernarbtes Lebergewebe mit Proliferation der Gallen-  
gewebe, sowie einzelne umgebaute Leberläppchen. Im übrigen  
jedoch ein weitgehend normales Restparenchym ohne die bei  
Tier III (9) beschriebenen Infiltrationen der Glissonfelder.  
Diagnose: Unspezifische Vernarbung, sonst keine path. Befunde.

Milz: kein path. Befund.

Niere: kein path. Befund.

## Kaninchen VI (12) B (s. S. 72)

Querschnittgelähmtes Tier.

Eine Injektion von nicht inkubiertem Solu<sub>6</sub> (Nr. 628) = 30 mg Fibrin  
Tötung: 7 Min. nach der Injektion - 300 mg Evipan + 25 ccm Luft i. v.

Sektion: Milz: deutlich getigert  
Blase: maximal gefüllt  
Herz u. V. jugularis, v. Cava sup., re. Vorhof, re. Kammer,  
Gefäße: A. pulmonalis mit Koagulum gefüllt; auch im li.  
Vorhofe einige Gerinnsel. Li. Kammer, Aorta u. V.  
cava inf. mit flüssigem Blut erfüllt.  
Lunge: gebläht, einige hämorrhag. Felder.

### Histologische Präparate:

Myocard: kein path. Befund

Aorta: kein path. Befund

Lunge: In ungleichmäßig beatmetem Organ eine sehr starke Blutfülle aller Gefäßanteile, wobei einzelne Anteile mit bes. viel Plasma gefüllt sind. In den Alveolen stellenweise etw. vermehrt eosinophil seröses Exsudat sowie desquamiierte alveolare Deckzellen.

Diagnose: Keine entzündliche Veränderung, keine Fibrinthromben.

Milz: kein path. Befund

Neben-  
niere: normales Organ

Leber: Im gehörig aufgebauten Leberparenchym eine deutliche, hyalintropfige sowie kleinvakuoläre Durchsetzung des Zytoplasma der Leberzellen; mehrfach doppelkernige Leberzellen.  
Diagnose: Trübe Schwellung.

Niere: Vorwiegend in den Hauptstückepithelien der Rinde eine oft erhebliche Vakuolisierung des Cytoplasmas und Abstoßung von Einzelzellen aus dem Epithelverband. Keine bemerkenswerte hyalintropfige Veränderung. Im Epithel der Tubuli reichlich fädiges, teils verklumptes bis wolkiges Eiweiß, keine Zylinder.  
Diagnose: Ausgeprägte trübe Schwellung.

## Kaninchen VIII (13) A

1. s. c. Injektion: 15. VI. 1962

Reinjektion<sub>1</sub> s. c. nach 7 Tagen

Reinjektion<sub>2</sub> s. c. nach 19 Tagen

je 2 ccm Solu<sub>1</sub> (Nr. 637 A); insgesamt 30 mg Fibrin.

Tötung: 13. VII. 1962 - 2 Tage nach der letzten Injektion - 300 mg

Evipan i. v.

Sektion: Leber: neben der Gallenblase bohngroßer

Abscess

Milz: bläuliche Flecken

Herz: Klappen glasig verdickt

Lunge: Knötchen von Hirsekorngröße, einige bräunliche  
Flecken.

Haut: Über der letzten Injektionsstelle entzündlich gerötet,  
auf der Schnittfläche ödematös mit weißlich käsigen  
Massen: Arthus-Phänomen.

### Histologische Präparate:

Myocard: Dissiminierte kleinste Muskelfasernekrosen mit geringer  
Mesenchymproliferation. Im wesentlichen dem Tier III (9)  
entsprechend.

Diagnose: Frische, dissiminierende Herzmuskelnekrose.

Lunge: Ungleichmäßige Gerüstinduration mit vereinzelt  
Granulomen (Stallinfekt?)

Leber: Schwere Vakuolisierung des Zytoplasmas der Leberparenchym-  
zellen im Zentrum und bis in die intermediäre Zone reichend,  
Doppelkernige Leberzellen im anschließenden Lebergewebe,  
keine Leberzell-Nekrose.

Diagnose: Acino-zentraler Leberzellschaden mit hydropischer  
Degeneration des Cytoplasmas.

Milz: kein path. Befund.

Niere: Noch stärker als bei Tier III (9) finden sich in den Schleifen-  
stücken neben zytoplasmatischen Vakuolen und Zellschwel-  
lungen Zelldetritus, wenig Eiweiß und reichlich Kalk in Form  
amorpher Niederschläge und Zylinder in den Tubulus-Lich-  
tungen. Auch hier einige nekrotische Zellen.

Diagnose: Frische (hypochlorämische?) Nephrose mit Kalk-

niederschlagen und Epitheldegeneration.

- Aorta: Im gesamten Mediabereich eine stellenweise ausgeprägte ödematöse bis vakuolige herdförmige Auflockerung der Faser-zwischensubstanz. In den Randzonen dieser Ödemseen wohl auch Faserverquellung.  
Diagnose: Akute Verquellung der Grundsubstanz mit Ödemseen.
- Haut: (2 Stellen) In beiden Stellen findet sich eine akute, teils leukozytäre und in der 2. Stelle rein hämorrhagische, hier stark nekrotisierende Entzündung, die bis in die Subcutis reicht. Der Befund würde einem Arthus-Phänomen entsprechen.  
Diagnose: Nekrotisierende, hämorrhagische eitrige Entzündung.

#### Kaninchen IX (14) B

1. s. c. Injektion: 18. VI. 1962  
7 Min. vor dem Tod 1 ccm Solu<sub>1</sub> (Nr. 637A) i. m. , 1 ccm s. c.  
insgesamt 20 mg Fibrin.
- Tötung: 13. VII. 1962 - 21 Tage bzw. 7 Min. nach der letzten Injektion - 300 mg Evipan i. v.
- Sektion: Leber: 3 weiße harte Knoten  
Lunge: 3 Blutungsstellen  
(Thymus von Bohnengröße).

#### Histologische Präparate:

- Myocard: (3 Stellen) kein pathol. Befund
- Lunge: (2 Stellen) Kleine subpleurale und intrapleurale Blutungen.
- Leber: Parasiten, sonst keine pathol. Befunde
- Niere: Leichte Eiweißnephrose mit Epithelschwellung, teilweise Epithelvakuolisierung und reichlich fädiges Eiweiß in den Tubulus-Lichtungen.  
Diagnose: Geringe Eiweißnephrose.
- Skelett-muskel: (Stelle der i. m. Inj.) Blutung und Ödem, frische Muskelnekrose.

Kaninchen X (15) A (s. S. 72)

1. Injektionsserie: 18. VI. - 22. VI. - 5 Injektionen von  
Fibrinogen (Nr. 637A)

Reinjektion<sub>1</sub> nach 6 Tagen

Reinjektion<sub>2</sub> nach 13 Tagen

insgesamt 60 mg Fibrinogen

Tötung: 20. VII. 1962 - 9 Tage nach der letzten Injektion - 300 mg Evipan.

Sektion: Abdomen: etwas Ascites

Leber: 3 gelbliche Stellen

Milz: Kraterförmige Narben

Nieren: etwas fleckig

Herz: kein pathol. Befund

Aorta: In der Aorta ascendens 4 raue Beete.

Lunge: Mehrere erhabene Felder, 3 hämorrhagische Stellen.

Histologische Präparate:

Myocard: (3 Stellen) Besonders in einem Schnitt deutliche feinfleckige interstitielle Verschielung mit Ersatz des Muskelgewebes durch zartes fasriges zellarmes Bindegewebe. Im übrigen eine winzige Knötchenbildung von Reticulumzellen um einige mittelgroße Gefäße.

Diagnose: Dissiminierende feinfleckige Verschielung.

Lunge: kein pathol. Befund

Leber: Außer einzelnen Parasitencysten kein path. Befund.

Niere: Befund einer geringen Eiweißnephrose.

Aorta: 2 typische arteriosklerotische Beete der Intima.

Kaninchen XI (16) A

(Parallelversuch zu Tier X)

1. Injektionsserie: 18. VI. - 22. VI. - 5 Injektionen von Solu<sub>6</sub> (Nr. 637A)

Reinjektion<sub>1</sub> nach 6 Tagen

Reinjektion<sub>2</sub> nach 13 Tagen

insgesamt 50 mg Fibrin

Tötung: 20. VII. - 9 Tage (bzw. 60 Min. nach s. c. Inj.)  
nach der letzten Injektion - 250 mg Evipan.

Sektion: Abdomen: etwas Ascites  
 Leber: Narbe  
 Milz: Kraterförmige Vertiefungen  
 Niere: Anämische Stelle  
 Lunge: Übersät mit erhabenen hellen Flecken,  
 keine Indurationen.  
 Herz: li. Ventrikel hypertroph.  
 Aorta: Übersät mit rauhen Beeten.  
 (Thymus bohngroß)

Histologische Präparate:

Myocard: kein path. Befund

Lunge: Überbläht, ungleichmäßige Gerüstverdickungen-

Leber: Parasiten, abgekapselt mit frischer Nekrose.

Milz: kein path. Befund.

Aorta: Atherosklerose.

Haut: (über der s. c. Injektion) Ödem der Subcutis und der Muskulatur,  
 (s. S. 72) sowie ausgedehnte Leukozyteninfiltrate. Keine Fibrin-Nieder-  
 schläge.

Kaninchen XII (17) B

1. Injektionsserie: 26. VI. - 2. VII. 1962 - 7 Injektionen v. Trypure -  
 Solu<sub>5</sub> (Nr. 637A, 640)

Reinjektion<sub>1</sub> nach 9 Tagen  
 insgesamt 130 mg "Fibrin" (?).

Tötung: 24. VII. 1962 - 9 Tage nach der letzten Injektion - 600 mg Evipan.

Sektion: Abdomen: etwas Ascites.  
 Leber: Vermehrte Läppchenzeichnung.  
 Milz: etwas fleckig.  
 Lunge: einige bräunliche Flecken neben erhabenen  
 hellen Stellen.  
 Herz: etwas Flüssigkeit im Herzbeutel, im Myocard  
 des linken Ventrikels eine helle Narbe,  
 Mitralis wärzchenförmige Auflagerungen.  
 Aorta: rauhe Beete.

### Histologische Präparate:

Myocard: (2 Stellen) Ödematöse Auflockerung der Muskelinterstitien (s. S. 72) mit lockeren Rundzellansammlungen bes. in einem der beiden Schnitte; kleinste frische Muskelfasernekrosen, keine älteren Schwielen

Diagnose: Seröse Myocarditis.

Lunge: Ungleich beatmet, unregelmäßig verdicktes Interstitium.

Diagnose: kein pathol. Befund.

Aorta: Atherosklerose, keine Fibrin-Niederschläge.

Leber, Milz, Niere: kein pathol. Befund.

### Kaninchen XIII (18) B s. S. 72)

1 Injektion: 28. VII. 1962 von Solu<sub>6</sub> (641 A)

insgesamt 8 mg Fibrin

Tötung: 28. VII. 1962 - 5 Min. nach der Injektion - 400 mg Evipan

Sektion: Leber: Eine weißliche Narbe.

Lunge: Subtotal hämorrhagisch infarziert, nur die Margines sind frei. In den Bronchien schaumiges Sekret.

Herz: Re. Kammer ausgefüllt mit fleckigem Gerinnsel, in der li. Kammer einheitlich hellrotes Coagulum.

### Histologische Präparate:

Myocard: Kein pathol. Befund.

Lunge: Herdförmige, etwas ungleich dichte Ödeme. Alveolaranschoppungen, die überall wie der Gefäßinhalt Fibrin-negativ sind. Im übrigen Lungengerüst eine sehr ausgeprägte Hyperämie.

Diagnose: Beginnende hämorrhagische Infarcierung, akute Hyperämie, keine Fibrin-Thromben.

Niere: Kein pathol. Befund.

### Kaninchen XIV (19) B

1 Injektion: 28. VII. 1962 von Solu<sub>6</sub> (Nr. 641 A)

insgesamt 8 mg Fibrin

Tötung: 28. VII. 1962 - 20 Min. nach der Injektion - 500 mg Evipan.

Sektion: Abdomen: Etwas Ascites  
 Leber: Mehrere weißliche Narben.  
 Herz: Etwas Flüssigkeit im Herzbeutel,  
 Endocard des re. Ventrikels übersät mit weißen  
 Flecken. In den Kammern Blutcoagel  
 Lunge: Re. Lunge subtotal hämorrhagisch infarziert,  
 li. Lunge überbläht; in den Bronchien schaumiges  
 Sekret.

#### Histologische Präparate:

Myocard: Kein pathol. Befund.

Lunge: Ausfüllung aller Bronchien mit überaus dichten Leukozyten,  
 desquamierten Deckzellen und Schleim, daneben teils kolla-  
 biertes, teils beatmetes Lungengewebe mit erheblichem des-  
 quamativem Katarrh im Bronchialbereich, an 2 Stellen eine  
 beginnende hämorrhagische Infarcierung mit Blutung in die  
 Alveolar- und Bronchiallumina.

Diagnose: Beginnender Infarkt, schwerste eitrige Bronchitis  
 und Peribronchitis.

#### Kaninchen XVI (20) B

1 Injektion: 9. VIII. 1962

nach 0,5 ccm (= 50 mg/kg Körpergew.) Depot Heparin Novo

Injektion von Solu<sub>2</sub> (Nr. 641A) insgesamt 15 mg Fibrin.

Tötung: 9. VIII. 1962 - 2 Min. nach der Injektion (Solu) - 500 mg Evipan

Sektion: Milz: Gefleckt.  
 Lunge: Zart und hellrot mit 3 hämorrhagischen Stellen.  
 Blutgefäße: Alle Gefäße, von der Injektionsstelle am Ohr  
 bis in die Lungenspitzen verfolgt, waren frei  
 von Gerinnseln, desgleichen Herz, Aorta,  
 Nieren- und Milzarterien und die Pfortader.

#### Histologische Präparate:

Weder in der Lunge noch in den übrigen Organen Zeichen einer Infarcierung.  
 In den Arteriolen der Lunge feynverteilte fibrilläre Strukturen, welche  
 fibrin-positiv sind.

## Kaninchen XIX B

1 Injektion: 12. IX. 1962

insgesamt ca. 45 mg Fibrin (!!) (s. S. 68) in 5 ccm Solu<sub>2</sub>  
Nr. 643c) 24 Std. b. - 18<sup>o</sup> C.

Klinische Beobachtung: Sofort nach der Injektion (2 Min.) schwerster Kollaps und heftige Atemnot. 5 Min. p. Inj. "Radfahrbewegung" in Seitenlage; 15 Min. p. Inj. Bradycardie (96 Min.), schwache Herzaktion; 20 Min. p. Inj. Herzstillstand und Tod.

Sektion: Herz: Im re. Herzen dichte Gerinnsel, li. Herz frei.  
Lunge: Zartrotes Parenchym, Bronchien frei.  
In den Lungenarterien und -arteriolen multiple konfluierende Gerinnsel.  
Gefäße: Im großen Kreislauf keine auffällige Thrombosierung.

Da der Befund "Tod durch Lungenembolie" (s. S. 72) als gesichert erschien, wurde auf die Anfertigung von histologischen Präparaten verzichtet.

## Diskussion der Befunde

Nachdem im vorhergehenden Kapitel die pathol. anat. Befunde dargestellt wurden, soll nun versucht werden, sie zu deuten. Wie bereits erwähnt (s. S. 76) bereitet dies Schwierigkeiten.

Auch wenn es - mit Ausnahme von Tier XIX - nicht gelungen ist, in größerem Umfang Fibrinthromben in der Lunge, sei es makroskopisch oder in histologischen Schnitten, sichtbar zu machen, so ist es doch nicht ausgeschlossen, daß Ab- und Umbauvorgänge auch nicht allergischer, entzündlicher Natur abgelaufen sind, welche das Fremdeiweiß weggeschafft haben, z. B. durch Fibrinolyse oder Phagozytose, ohne daß es zu Gewebsproliferationen kam (vergl. "Disappearance of Clot-Emboli in Rabbits" (77).

Es erscheint zweckmäßig, zunächst die an sensibilisierten Tieren A (I, III, XI, V, X, VIII) beobachteten Veränderungen genauer zu betrachten und sie für jedes Organ einzeln mit den nichtantikörperbildenden Tieren B (II, IV, VI, IX, XII, XIII, XIV, XVI, XIX) zu vergleichen.

## Das Myocard

Außer Tier V und XI zeigen alle Tiere der Gruppe A frischere oder ältere Verschwielungen, die auf eine Myocarditis hindeuten; es sei besonders auf die Herzmuskelnekrosen des s. c. sensibilisierten Tieres VIII hingewiesen.

Im Gegensatz dazu zeigen nur zwei Tiere der Gruppe B (II, XII) Veränderungen im Sinne einer eitrigen bzw. serösen Myocarditis.

Da die Myocardveränderungen bei den sensibilisierten Tieren (4 von 6) relativ häufiger sind als bei den nicht allergisierten (2 von 7), dürften sie vorwiegend allergischer Genese sein.

Der Prozentsatz an Myocarditiden der Gruppe B wird noch kleiner, wenn man Tier XII als eventuell "trypure-bedingten" (54) Sonderfall ausklammert.

Schwielen bzw. Nekrosen des Myocards könnten aber auch nach coronaren Durchblutungsstörungen entstanden sein (6). Ob sie durch kleine dissimierte Thrombosen oder durch Kollaps-Zustände hervorgerufen wurden, läßt sich nicht entscheiden.

## Die Aorta

Eine Atheromatose zeigten fast alle Tiere der Gruppe A und nur etwa ein Drittel der nicht sensibilisierten Tiere. Den Veränderungen der Aorta kann jedoch, wenngleich Mediasklerosen auf allergischer Grundlage beschrieben werden (62), keine Versuchsbedingtheit zugrunde gelegt werden. Sie fanden sich auch bei Tieren, die die erste Injektion nur drei Tage (IV), ja 20 Min. (XIV) überlebten.

## Die Lunge

Die Tatsache, daß dieses allergisch "reaktionsarme" Organ in 80 % der Antikörperbildner Gerüstverdickungen und bei rasch getöteten Tieren (XIII, XIV, VI) eine beginnende Infarcierung - im Falle des Kaninchens XIX sogar tödliche Embolien - zeigt, und auch bei nicht sensibilisierten Tieren Granulome auftraten (als Ausdruck einer "Fremdkörperwirkung") (62), deutet darauf hin, daß die besondere Beschaffenheit unseres Injektionsmittels es gestattet, hier einen lokalen Reiz zu setzen (vergl. Kallós 38). Besonders erwähnt sei, daß das mit Heparin vorbehandelte Tier XVI im Vergleich mit Tier XIII (ohne Heparin) keine eigentliche Infarcierung aufwies.

Wie bereits vermerkt, ist es uns beim Tierversuch XIX, ohne daß wir es wollten, "gelungen", einen Modellfall für eine Thrombo-Embolie zu schaffen. Die Ursache dafür könnte sowohl in der durch den relativ hohen "Blutverlust" ("Entnahme von 20 ccm Blut zu Versuchszwecken vor der Injektion) bedingten erhöhten Eigengerinnbarkeit (81) des Blutes, als auch in der Frische

24 Std. b.  $\sim 18^{\circ}$ ) und der hohen Fibrinkonzentration - für gewöhnlich enthielt 1 ccm Solu<sub>6</sub> 4 mg Fibrin, während das hier verwendete Präparat 8,7 mg/ccm Solu<sub>2</sub> enthielt - des Injektionsmittels liegen.

Daß es in keinem der übrigen Versuche zu diesen massiven Lungenembolien kam, liegt wohl daran, daß die Bedingungen nicht so extrem waren und die fibrinolytischen Kräfte (77) zur Beseitigung von eventuell auftretenden Mikrogerinnseln ausreichten, oder aber eine Organisation (Granulombildung) einsetzte

### Die Niere

Die Zeichen einer geringen Eiweißnephrose bzw. einer trüben Schwellung sind nach R. Marx für Kaninchen fast "physiologisch". Lediglich die Zeichen einer nekrotisierenden degenerativen "Nephrose" bei den besten Antikörperbildnern (III, VIII) können als das Ergebnis einer AA-Reaktion gewertet werden.

### Leber und Milz

Diese eigentlich zur allergischen Reaktion prädestinierten Organe zeigten nur in zwei Fällen (III, VIII) eine Parenchym-Veränderung. (Die trübe Schwellung der Leber bei Tier VI könnte vom bestehenden Wirbelbruch mit Querschnittslähmung herrühren)

Eine Erklärung für die minimalen Reaktionen dieser an RES reichen Organe ist damit gegeben, daß die Hauptmenge des Antigens bereits in der Lunge abgefangen wurde.

Dafür spricht auch die Tatsache, daß der Nachweis von Antigen im großen Kreislauf - also nach der Lungenpassage -, von den Versuchen mit Fibrinogen abgesehen, nur bei den voll heparinisierten Tieren (XVI, XVIII) gelang, während ein Nachweis von Solu unter normalen Versuchsbedingungen nur aus Gerinnseln des rechten Herzens (VI) und der Lunge (XIX) möglich war.

Heparin mit möglichst unverändertem Blut (vgl. die Untersuchungen in silikonisierten Gläsern S. 11) vermag demnach die Resynthese zu hemmen; damit gewänne die Hypothese von Seegers, Thrombin sei zur Polymerisation notwendig, wieder eine Stütze. Wahrscheinlicher ist jedoch - besonders im Verein mit den in Teil I aufgezeigten Versuchen - eine Fibrinolysbeschleunigung durch Heparin.

### Reaktionen der Haut

Es wurden nur zwei schon makroskopisch als allergisch reaktiv erkannte Hautstellen histologisch untersucht; beide stammten von Tieren der Gruppe A

VIII XI; und zeigten die Symptome, wie sie für das Arthus-Phänomen charakteristisch sind. Die zwei Tage nach der Erfolgsinjektion entnommene Haut wies eitrige, nekrotisierende Entzündungsherde auf (VIII), die 20 Min nach der Reinjektion excidierte Hautstelle zeigte die für die Frühreaktion charakteristische Leukozyteninfiltration mit Ödem. (XI)

### Übersicht der pathologisch-histologischen Veränderungen

- allergo-thrombopathische Veränderungen
- keine Veränderungen
- nicht untersucht

| Tier                           | I | II | III | IV | V   | VI  | VIII | IX | X | XI | XII | XIII | XIV | XVI | XIX |
|--------------------------------|---|----|-----|----|-----|-----|------|----|---|----|-----|------|-----|-----|-----|
| Gruppe                         | A | B  | A   | B  | A   | B   | A    | B  | A | A  | B   | B    | B   | B   | B   |
| Organe:                        |   |    |     |    |     |     |      |    |   |    |     |      |     |     |     |
| Myocard                        | + | +  | +   | -  | -   | -   | +    | -  | - | -  | -   | -    | -   | -   | -   |
| Aorta                          | - | -  | -   | +  | -   | -   | -    | -  | - | -  | -   | -    | -   | -   | -   |
| Lunge                          | - | +  | -   | -  | -   | -   | -    | -  | - | -  | -   | -    | -   | -   | -   |
| Niere                          | + | +  | +   | +  | -   | +   | -    | -  | - | -  | -   | -    | -   | -   | -   |
| Leber                          | / | -  | -   | -  | (+) | (+) | -    | -  | - | -  | -   | -    | -   | -   | -   |
| Milz                           | - | -  | -   | -  | -   | -   | -    | -  | - | -  | -   | -    | -   | -   | -   |
| Haut                           |   |    |     |    |     |     |      | -  | / | +  | /   | /    |     | /   | /   |
| makros-<br>kopische<br>Thromb. |   |    |     | +  |     |     |      |    |   |    |     | (+)  | (+) |     | -   |

### Zusammenstellung der nichtgetöteten Tiere

Tier VII : Injektion v. Harnstoff m 4, 5 (s. S. 98)

Tier XV : Versuch einer lokalen Anaphylaxis nach passiver Immunisierung (s. S. 72)

Tier XVII: Injektion von 5 ccm Solu<sub>2</sub> (641c) (ohne Heparin)

Tier XVIII: Injektion von 125 mg Heparin  
und von 5 ccm Solu<sub>2</sub> (641C) (s. S.111)

### Zusammenfassung:

Als rein allergischer Genese können nur die für Tier VIII beschriebenen Veränderungen gelten.

Die pathol. anatom. Veränderungen der Tier-Gruppe A sind eindeutig zahlreicher als die der Gruppe B; wie weit sie jedoch allergischen Ursprungs sind, läßt sich nicht sagen.

Eine bakterielle Komponente ist wenigstens für die mit Solu injizierten Tiere so gut wie ausgeschlossen (s. S. 67).

Eine umfassende Diagnose stellt der von R. Marx geprägte Terminus "Myocardio-angio-pathia heterofibrinica allergica-thrombotica" dar.

Eine Differenzierung würden folgende Versuche erlauben:

Es müssten gesunde Tiere verwendet werden, möglichst von einem Wurf, eventuell unter Antibiotika-Schutz.

Tier<sub>1</sub>: Es würde s. c. allergisiert, mit Solu<sub>6</sub>.

Die festgestellten pathol. anatom. Veränderungen wären rein allergischer Genese.

Tier<sub>2</sub>: Es würde s. c. allergisiert, erhielte im anaphylaktischen Zustand inkubiertes Solu-Fibrin. Da die AA-Reaktion in vitro abgelaufen wäre, käme es nur zu einer schwachen anaphylaktischen Reaktion. Im Vergleich mit den bei Tier<sub>1</sub> gefundenen Veränderungen könnten die durch das Substrat zusätzlich gesetzten Veränderungen festgestellt werden.

Tier<sub>3</sub>: Einem bis dahin unbehandelten Tier würde nach Entnahme der zur Inkubation notwendigen Citratblutmenge antikörperhaltiges Serum von Tier<sub>1</sub> gespritzt. Bei dieser passiven Immunisierung käme es (bei der Injektion des Inkubationsgemisches) in vivo zur AA-Reaktion und somit zu einem heftigen Schock, so daß bei diesem Tier vorwiegend die Folgen des Kollapses zur Beobachtung kämen.

Tier<sub>4</sub>: Ein sicher gesundes Tier - eventuell unter Antibiotika-Schutz - sollte Citratblut-Solu-Gemisch intravenös erhalten. Da jegliche AA-Reaktion ausgeschlossen wäre, hätten wir hierbei die reine Substrat-Wirkung.

Ein Vergleich dieser Versuchsergebnisse ließe wenigstens in etwa eine Abtrennung der einzelnen Wirkungskomponenten zu.

Isoliert durch Solufibrin bedingte Veränderungen zu beobachten - ohne allergische Komponenten -, ist nur mit Iso- oder Autofibnation zu erreichen. Das verwendete Fibrinogen mußte ein höchst gereinigtes Präparat (40) sein. Da die Vorbereitungen dazu - es wurde bereits Kanin. - Fgen gewonnen - von R. Marx bereits getroffen sind, kann auf die Differenzierung nach obigem Schema verzichtet werden.

### III. Die antikörperhaltigen Sera und sonstige Blutbefunde

Wie bereits berichtet (s. S. 71) haben 6 unserer 7 Kaninchen, die Gelegenheit zur Antikörperbildung hatten, dies getan. Daß Tier XII keine Antikörper bildete, liegt wohl daran, daß das Fibrin trotz des Hemmversuches mit Trasyloyl soweit abgebaut wurde, daß die Teilchen (kleine Peptide oder Aminosäuren) nicht mehr als Antigen wirksam wurden.

Neben der Untersuchung auf Antikörper als einem Hauptziel der Tierexperimente wurden auch unspezifische Blutbefunde erhoben, nicht systematisch, sondern nur als Stichproben.

#### Die Blutsenkung (86)

Nachdem R. Marx und K. Sasse (59c) nachgewiesen haben, daß nicht nur (Rinder-) Fibrinogen (28), sondern auch mit Streptokinase (Sk) abgebautes Fibrin, das noch relativ hochmolekular ist, die Senkung zu beschleunigen vermag, wurde Citratblut mit Solu-Fibrin, also Harnstoff-abgebautem Fibrin, 1:1 gemischt, zur Senkung angesetzt.

Um sowohl Beschleunigung als auch Verlangsamung zu erfassen, wurden hochsenkende Sera (Patientin K. : Cholangiopathie (1), Patientin M. : Morbus Hodgkin (2) ) verwendet.

Die BSG unter Zugabe bestimmter Stoffe:

- a) Citratblut (1 ccm Natrium-Citrat 3,8 % + 4 ccm Venenblut)  
 b) " " : phys. NaCl = 1:1 NaCl - Senkung  
 c) " " : 0,75 % Fgen = 1:1 Fgen - "  
 d) " " : Harnstoff = 1:1  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  - Senkung  
 (m 4, 5)  
 e) " " : Solu<sub>1</sub> (7,5 = 1:1 Solu - Senkung  
 1 mg Fb)

Die BSG unter Zugabe von phys. NaCl, Fgen, Harnstoff oder Solufibrin.

|    | Zeit    | 1a               | 1b   | 1c               | 1d                   | 1e                                | 2a    | 2b  | Σ c     | 2d                                | 2e    |
|----|---------|------------------|------|------------------|----------------------|-----------------------------------|-------|-----|---------|-----------------------------------|-------|
| 1) | 60/120  | 83/102           | 9/19 | 183/189          | 4/5                  | 62/87                             | 51/68 | 6/9 | 138/144 | 3/4                               | 42/66 |
| 2) | 12 Std. | 123              | 120  | 160              | 20-30                | 148                               | 107   | 80  | 156     | 15-20                             | 150   |
| 3) | 16 Std. | gelblich<br>trüb |      | klar<br>(+ Th ↓) | Schleier-<br>senkung | klar<br>(+ $\text{H}_2\text{O}$ ) | klar  |     | klar    | Schleier-<br>senkung <sup>+</sup> | klar  |
| 4) | 16 Std. | Geld-<br>rollen  |      |                  | glatt<br>ausgebr.    | Fibrin-<br>Fäden                  | 1a    | 1b  | 1c      | 1d                                | 1e    |

1) Senkungsgeschwindigkeit

2) Restsenkung

3) Beobachtungen am Senkungsplasma

4) Mikroskopische Beobachtung der Erythrozyten

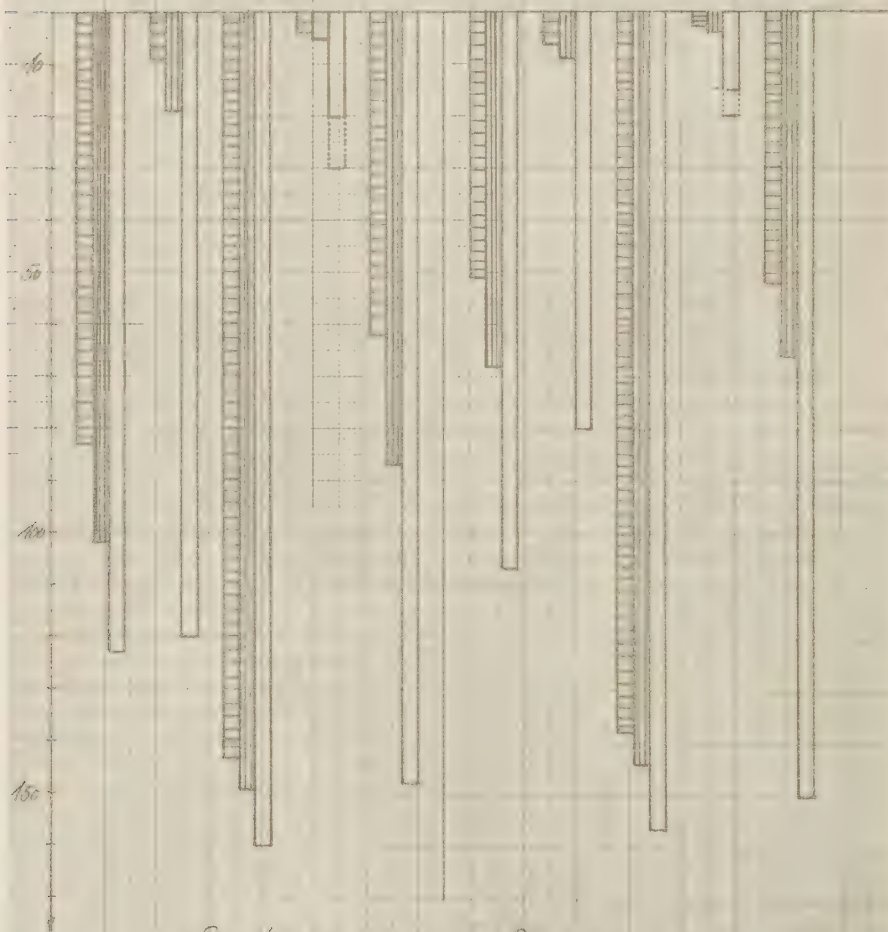
+) In der Klinik wird die Schleiersenkung bei Urämie beobachtet; in unserem Fall wurde der Rest-N durch Harnstoff erhöht.

Die Senkung d' unter Zusatz von  
 1 mgr. V<sub>2</sub> b, 1 Gen. c, 1 mgr. d' und 1 mgr. e

Cholangiopathie

Morbus Hodgkin

a b c d e a b c d e

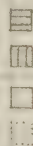


Senkung nach 1 Stunde

" " 2. Stunden

Restsenkung

Schleimsenkung



Ergebnis: Die Senkungsergebnisse zeigen, daß Verdünnung mit den Lösungsmitteln NaCl und Harnstoff die BSG hemmt, und zwar geschieht dies durch Harnstoff in einem höheren Maße als durch phys. NaCl. Besonders deutlich wird die Verminderung der Senkungsgeschwindigkeit bei Beobachtung der Restsenkungen. Da wegen der Verdünnung nur die halbe Menge der Erythrozyten vorhanden ist, müßte sie eigentlich sehr hoch sein (vergl. hochgradige Anaemien). Hier ist wohl die Herabsetzung des Fgen-Gehaltes ausschlaggebend.

Daß die "Fibrinogen-Senkung" trotz der Hemmwirkung (?) des enthaltenen NaCl erhöht ist, spricht für die bereits bekannte Senkungsbeschleunigung durch dieses Protein oder daran haftender "Akzeleratoren" (Ruhenstroth-Bauer).

Daß die "Solu-Senkung sowohl hinter der reinen Citratblutsenkung als auch hinter der Fibrinogen-Senkung bzw. der mit Sk-abgebautem Fb angesetzten Senkung (59c) nachhinkt, dürfte seine Ursache in der starken Hemmwirkung des enthaltenen Harnstoffs haben.

Die Wirkung der im Tierversuch applizierten Mengen von Harnstoff, Fibrinogen und Solu-Fibrin auf die BSG:

|            | Zeit    | VII 5 ccm m4, 5<br>NH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub> |         | VI 5 ccm Solu <sub>6</sub> |         | V 5ccm Fgen |         | 0 5ccm NaCl |         |
|------------|---------|------------------------------------------------------|---------|----------------------------|---------|-------------|---------|-------------|---------|
| Entnahme   |         | vor                                                  | 5' nach | vor                        | 5' nach | vor         | 5' nach | vor         | 5' nach |
| Senkung    | 60, 120 | 2/4                                                  | 2/3-4   | 9/11                       | 25/40   | 2/3         | 4/5     | 2/3         | 3/4     |
| Rest-Senk. | 12 Std. | 17                                                   | 20      | 20                         | 85      | 90          | 78      | 20          | 25      |

Ergebnis: Die Auswirkungen der intravenösen Injektionen entsprechen in etwa den in vitro gefundenen. Die starke Erhöhung durch Solu-Injektion (VI) ist nicht das Ergebnis einer "idealen Mischung", da ja Solu hierbei nicht inkubiert zur Bildung eines Gerinnsels in vivo führte (s. S. 82).

Zur Frage der Gerinnungsbeeinflussung

Da es hätte sein können, daß die Solu-Fibrin-Injektion die Blutgerinnungskonstanten beeinflusst, wurde zunächst die Prothrombinzeit (58) vor und nach der Injektion bestimmt.

|                       |       |        |           |                     |                       |                                 |
|-----------------------|-------|--------|-----------|---------------------|-----------------------|---------------------------------|
| Prothrom-<br>bin-Zeit | 0     | X:Fgen | XI:"Solu" | XII:Try-<br>pure S. | XIX:Solu <sub>2</sub> | III: Solu <sub>6</sub><br>Ak: + |
| Vor d. Inj.           | 17,1" | 15,3"  | 16,9"     | 12,5"               | 17,2                  | 16,6"                           |
| nach d.<br>Inj.       |       | 15,2"  | 16,4"     | 14,7"               | 16,0"                 | 20,8"                           |

Ergebnis: Die Pt-Zeit blieb nach der ersten Injektion von Fibrinogen und Solu annähernd konstant. Beim sensibilisierten Tier III kam es zum Abfall des PtI, eventuell verursacht durch die beim "Schock" mögliche Heparinämie. Trypure-Solu ließ die Pt-Zeit ansteigen, erklärbar durch Pt-Verbrauch, beruhend auf einer intravasalen Gerinnung durch Trypsin.

Erstaunlich ist, daß das Tier XIX nicht mit einem Anstieg der Pt-Zeit reagiert hat. Die massive Gerinnselformung in der Lunge sowie der vorangegangene Blutverlust hätten zu einer "Verbrauchskoagulopathie" (85f) und zur Abnahme des PtI (81) führen müssen - vorausgesetzt, daß Pt, zu Th aktiviert, verbraucht wurde.

Es sei denn, daß das entstandene Gerinnsel ausschließlich aus Solu-Fibrin bestand, zu dessen Ausfällung kein Th verbraucht wurde. Es wäre aber auch möglich, daß sich die induzierten Veränderungen mit der angewandten Methode nicht nachweisen lassen (80).

Um etwaige Veränderungen der Gerinnselformung sowie der Lysisvorgänge festzuhalten, bedienen wir uns der photokymographischen Aufzeichnung, die das Thrombelastogramm (31) liefert.

|                                             | XIII vor    nach<br>8mg Fb |         | XIX vor    nach<br>45 mg Fb |       | Normal  |
|---------------------------------------------|----------------------------|---------|-----------------------------|-------|---------|
| Reaktions-<br>zeit        r                 | 2,5 min                    | 3,5 min | 2,7 min                     | 3 min | 4-8 min |
| Zeit d. Gerinn-<br>selbildg. K <sub>1</sub> | 4,5 min                    | 7,5 min | 4 min                       | 2 min | 3-7 min |
| m <sub>ε</sub>                              | -                          | -       | 79                          | 177   | 80-180  |

Ergebnis: Aus den minimalen Abweichungen der resultierenden Konstanten kann - nachdem sie im Normbereich liegen - kein Rückschluß auf gerinnungs-physiologische Veränderungen gezogen werden.

Bei Gerinnungsvorgängen, wie sie im Falle einer Resynthese in vasis ablaufen würden, käme es zu einer Adsorption von Thrombozyten und Leukozyten.

Veränderungen von Thrombo- und Leukozytenzahl (15; 7):

| Entnahme               | Thrombozyten |                        | Leukozyten |               |
|------------------------|--------------|------------------------|------------|---------------|
|                        | vor          | 4' (20') nach          | vor        | 4' (20') nach |
| Tier XIII<br>(8 mg Fb) | 369.000      | 180.000                | 7.150      | 3.150         |
| Tier XIX<br>(45 mg Fb) | 373.200      | 107.400 <sup>+) </sup> | 7.200      | 3.800         |

Ergebnis: Der Abfall sowohl der Thrombozyten als auch der Leukozyten spricht für eine intravasale Gerinnung.

Die in der Zählkammer bei Tier XIX beobachteten Agglomerate<sup>+)</sup>  könnten auf die von Subairow beschriebene (81) Zunahme der Adhäsionsfähigkeit der Blutplättchen zurückgeführt werden. Dafür spräche auch die Verbreiterung des TEG ( $m_{\xi}$  : 79/127).

Zusammenfassung:

Insgesamt sprechen die Blutbefunde für eine mäßige Gerinnungsstörung - bedingt durch eine intravasale Gerinnung - wahrscheinlich allein des injizierten Solu-fibrins.

Eine hämorrhagische Diathese auf Grund von Fibrinogen-Mangel, wie sie Antikörper gegen Fibrinogen induzieren könnten, kommt hier nicht in Frage, da wie S.11: gezeigt wird, die gebildeten Antikörper gegen Kanin.citratplasma (=Fibrinogen) nicht wirksam wurden. Bei einer Sensibilisierung von Rindern mit Humanfibrinogen könnte es der großen Ähnlichkeit der Proteine halber sehr wohl zur Iso-Ak-Bildung kommen.

(Kreuzreaktion s. S.107)

## Die antikörperhaltigen Sera

Nach dem kurzen Bericht über allgemeine Blutuntersuchungen soll vom speziellen Ergebnis unserer Versuche, den antikörperhaltigen Sera, die Rede sein.

### Die Gewinnung und Aufbewahrung der Sera

Den Versuchstieren wurde Nativvenenblut entnommen, das bis zu 60 Min. bei  $37^{\circ}\text{C}$  gehalten gut durchgeronnen war. Das durch Zentrifugieren über 10 Min. bei 4000 Umdrehungen gewonnene Serum wurde in paraffinierte Gläser pipetiert und in der Tiefkühltruhe bei  $-18^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt; ein Teil wurde lyophil getrocknet.

Sollten Tests angesetzt werden, so mussten die Sera zu wiederholten Malen aufgetaut werden, was unserer Erfahrung nach wie auch den Angaben von Wright und Shomaker (91) zu Folge keinen Einfluß auf die Antikörper hat. Erprobterweise war auch nach Monaten noch keine Denaturierung eingetreten.

### Das Maß der Antikörperhaltigkeit

Da wir bereits beim ersten Tier die Erfahrung machten, daß nach der Primärinjektion - auch nach einer Serie von Injektionen im Abstand von je 24 Stunden - noch keine Antikörper nachweisbar waren, haben wir bei den folgenden Experimenten frühestens 6 Tage nach der ersten Reinjektion versucht, antikörperhaltige Sera zu gewinnen. Dies schließt jedoch nicht aus, daß Antikörper entweder in geringem Maße oder nur sehr kurze Zeit (85a) nach der Erstinjektion vorhanden waren.

Erfast wurden von uns nur Sera mit relativ hohem und bleibendem Antikörpergehalt, also die Ergebnisse einer sekundären allergischen Reaktion.

Die Schwankungen des Ak-Spiegels konnten wir sehr deutlich an 12 von Tier III zu verschiedenen Zeiten gewonnenen Sera sehen, und zwar am verschieden starken Ausfall der Präzipitationslinien im Test nach Ouchterlony (Foto S. 74) und an den angesetzten Verdünnungsreihen (Kurve S. 103).

Der Ausfall von Präzipitaten beim Geldiffusionstest von 1 % Fgen mit Anti-Sera, verdünnt mit NaCl:

Tier III

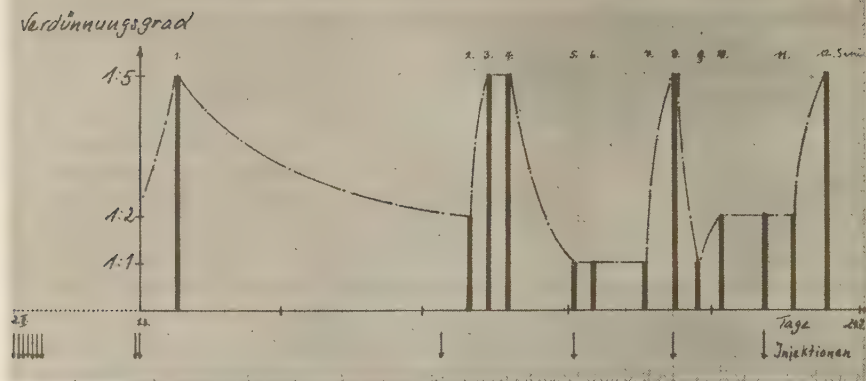
| Sera<br>n Tage/<br>plnj. | 7/ReI | 6/II <sup>+) </sup> | 10/II | 16/II | 25/II | 4/III | 13/III |
|--------------------------|-------|---------------------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Verdünnng.               | 1)    | 2)                  | 3)    | 4)    | 5)    | 6)    | 7)     |
| 1:0                      | +     | +                   | +     | +     | +     | +     | +      |
| 1:1                      | +     | +                   | +     | +     |       |       |        |
| 1:2                      | +     | +                   | +     | +     |       |       |        |
| 1:5                      | +     |                     | +     | +     |       |       |        |

Tier III (Forts.)

| Sera<br>n Tage/<br>post Inj. X | 21/III | 5/IV | 20/IV | 6/V | 13/V |
|--------------------------------|--------|------|-------|-----|------|
| Verdünnng.                     | 8)     | 9)   | 10)   | 11) | 12)  |
| 1:0                            | +      | +    | +     | +   | +    |
| 1:1                            | +      | +    | +     | +   | +    |
| 1:2                            | +      |      | +     | +   | +    |
| 1:5                            | +      |      |       |     | (+)  |

<sup>+)</sup>  6/II bedeutet: 6 Tage nach der II. Reinjektion.

Die Höhe des Antikörperspiegels von Tier III  
Positiver Ausfall des Geldiffusionstests bei Verdünnung



Tier V (s. S. 72)

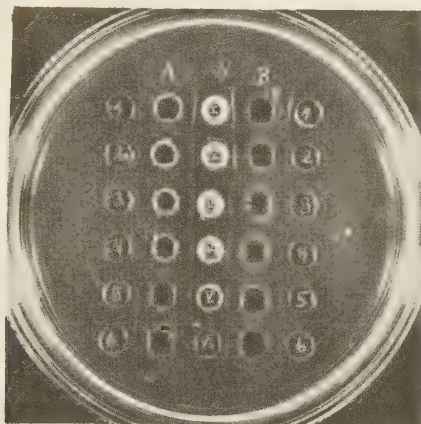
| Sera<br>n Tage/<br>post Inj. X | 8/ReI | 12/I | 21/I | 29/I | 5/II | 19/II | 6/III | 13/III |
|--------------------------------|-------|------|------|------|------|-------|-------|--------|
| Verdünnung                     |       |      |      |      |      |       |       |        |
| 1:0                            | +     | +    | +    |      | +    | +     | +     | +      |
| 1:1                            | +     | (+)  |      |      | +    | +     | +     | (+)    |
| 1:2                            | (+)   |      |      |      | +    | +     | +     |        |
| 1:5                            |       |      |      |      |      | +     |       |        |

Tier VIII

| Sera<br>n Tage/<br>post Inj. x | 5/ReI | 10/I | 19/I |
|--------------------------------|-------|------|------|
| Verdünnung                     |       |      |      |
| 1:0                            | +     | +    | +    |
| 1:1                            | (+)   | +    | +    |
| 1:2                            |       |      | +    |
| 1:5                            |       |      |      |

Ergebnis: Tier III zeigte bereits 7 Tage nach der ersten Reinjektion (insgesamt 150 mg Fibrin) eine starke Ak-Bildung. Die Reaktion von Tier V zu demselben Zeitpunkt (insgesamt 250 mg Fibrinogen!) war nur halb so intensiv und entsprach in etwa der bei Tier VIII 5 Tage nach der ersten Reinjektion (insgesamt 60 mg Fibrin) beobachteten Stärke des Ausfalls. Ob das Antigen (Fibrin oder Fibrinogen) bzw. die Applikationsart (i. v. oder s. c.) einen Einfluß auf die Höhe des resultierenden Antikörpertiters hat, läßt sich nicht entscheiden, da die Fähigkeit der Bildung von Immunglobulinen hohen individuellen Schwankungen unterworfen ist.

Die Prüfung des Antigengehaltes lyophil getrockneter und in verschiedenen großen Mengen  $H_2O$  gelöster Antisera.



Reihe A: Fibrinogen vom Rind, hergestellt im Labor R. Marx nach Keckwick (407, 0,4 %ig.)

Reihe B: Fibrinogen vom Rind (Behringwerke) 1 %ig.

|     |                 |                                                           |   |
|-----|-----------------|-----------------------------------------------------------|---|
| I   | Trockensubstanz | aus 0,5 ccm Ser. v. Kan. III (13 Tg. p. re <sub>5</sub> ) |   |
|     |                 | in 0,1 ccm $H_2O$ aufgelöst                               | + |
| II  | Trockensubstanz | aus 0,5 ccm Ser. v. Kan. III (13 Tg. p. re <sub>5</sub> ) |   |
|     |                 | in 0,2 ccm $H_2O$ aufgelöst                               | + |
| III | Trockensubstanz | aus 0,5 ccm Ser. v. Kan. III (13 Tg. p. re <sub>5</sub> ) |   |
|     |                 | in 0,3 ccm $H_2O$ aufgelöst                               | + |
| IV  | Trockensubstanz | aus 0,5 ccm Ser. v. Kan. III (13 Tg. p. re <sub>5</sub> ) |   |
|     |                 | in 0,4 ccm $H_2O$ aufgelöst                               | + |
| V   | Trockensubstanz | aus 0,5 ccm Ser. v. Kan. III (13 Tg. p. re <sub>5</sub> ) |   |
|     |                 | in 0,5 ccm $H_2O$ aufgelöst                               | + |

|                                                                              |     |
|------------------------------------------------------------------------------|-----|
| VI Trockensubstanz aus 0,5 ccm Ser. v. Kan. III (13 Tg. p. re <sub>5</sub> ) |     |
| in 1,0 ccm H <sub>2</sub> O aufgelöst                                        | +   |
| 1) Serum vom Kaninchen V (5 Tg. p. re <sub>2</sub> ) (nicht getrocknet)      | +   |
| 2) Serum vom Kaninchen III (5 Tg. p. re <sub>4</sub> ) (nicht getrocknet)    | (+) |
| 3) Normal-Kaninchen-Serum                                                    | -   |
| 4) Antifibrinogenserum (Behringwerke)                                        | -   |
| 5) Trockensubstanz aus 0,5 ccm Ser. v. Kan. V. (5 Tg. p. re <sub>2</sub> )   |     |
| in 0,25 ccm H <sub>2</sub> O                                                 | +   |
| 6) Serum vom Kaninchen IV (13 Tg. p. re <sub>5</sub> ) (nicht getrocknet)    | +   |

Ergebnis: Der positive Ausfall des Geldiffusionstestes ließ sich durch Gefrier-trocknen der Sera und Wiederauflösen in kleineren Mengen von H<sub>2</sub>O deut-lich intensivieren.

Dies ist vor allem für die Untersuchung von Patienten-Sera auf Fibrin-abbau-Produkte von Bedeutung, da hierbei der Antigengehalt eine gegebene Größe ist.

(Die dichteren Präzipitationslinien ließen sich natürlich auch mit höhe-ren Fgen-Konzentrationen erreichen.)

### Die Spezifität der antikörperhaltigen Sera

Daß die Spezifität der Antikörper abhängig ist von der Reinheit des ver-wendeten Antigens und wir deshalb bemüht waren, nicht gerinnbare Protei-ne durch die Umfällung des Solufibrins auszuschalten, wurde bereits erörtert.

Die Ergebnisse der Immunelektrophoretischen Untersuchungen, für deren Durchführung wir Herrn Professor Dr. H. E. Schultze, Marburg, sehr ver-bunden sind, zeigen, daß diese Arbeit nicht vergebens war.

# Zusammenstellung der Immunelektrophoretischen Untersuchungen

|                                                                               | Human -<br>serum | Rinderserum<br>$\alpha_2$ Makro<br>Globuline | $\alpha_2$ Makro<br>Globuline | Human -<br>fgen | Rinder -<br>fgen | 2 Kompo-<br>nenten |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------|----------------------------------------------|-------------------------------|-----------------|------------------|--------------------|
| Kan. I: 5 Tg. p.<br>Re <sub>I</sub> (Solu 588)<br>(kein Foto)                 |                  | +                                            |                               |                 | +                |                    |
| Kan. III: 13 Tg<br>p. Re <sub>III</sub> (Solu 628)<br>(220 mg Fb!)            |                  | +                                            |                               | +               | +                | +                  |
| Kan. V: 8 Tg. p.<br>Re <sub>I</sub> (Fgen 628)<br>(330 mg Fgen)               |                  | +                                            | +                             |                 | +                | +                  |
| Kan. V: 13 Tg. p.<br>Re <sub>III</sub> (Fgen 628)<br>(360 mg Fgen)            | ?                |                                              |                               | (+)             | +                |                    |
| Kan. VIII: 5 Tg. p.<br>Re <sub>I</sub> (Solu <sub>1</sub> 637A)<br>(20 mg Fb) | ?                |                                              |                               | +               | +                | +                  |
| Kan. X: 6 Tg. p.<br>Re <sub>II</sub> (Fgen 637)<br>(60 mg Fgen)               |                  | +                                            | +                             |                 | +                | +                  |
| Kan. XI: 6 Tg. p.<br>Re <sub>II</sub> (Solu <sub>6</sub> 637)<br>(50 mg Fb)   |                  |                                              | +                             |                 | +                | +                  |

Ergebnis: Auch wenn die Spezifität aller Anti-Sera eine relative ist, so zeigt sich doch deutlich, daß die durch Injektion von Solufibrin gewonnenen Sera reiner sind als die durch Injektion von Fibrinogenlösung gewonnenen Ak-Sera. Als Beweis sei auf die Immunelektrophoretischen Bilder der Sera X und XI verwiesen (s. S. 110).

Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, daß das Antiserum von Kaninchen III nicht mit Proteinen von Humanserum reagiert.

Sera dieses Tieres wurden bei unseren Untersuchungen hauptsächlich verwendet.

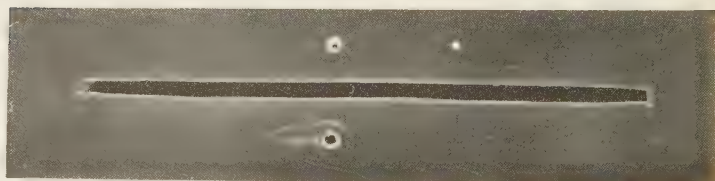
Kaninchen III  
Solufibrin 6 (Nr. 628) i. v.

Serum vom 14. 6. (13 Tage  
post reinjectionem<sub>3</sub>)

Humanserum

Anti-Solufibrin-  
serum

Humanfibri-  
nogen



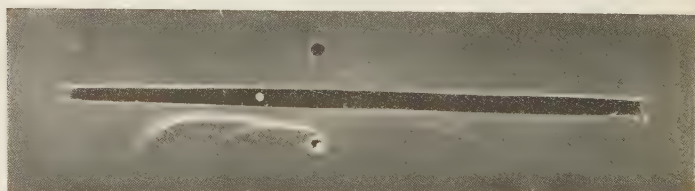
Fibrinogen

$\alpha_2$  - Makroglobulin

Rinderserum

Anti-Solufibrin-  
serum

Rinderfibrinogen



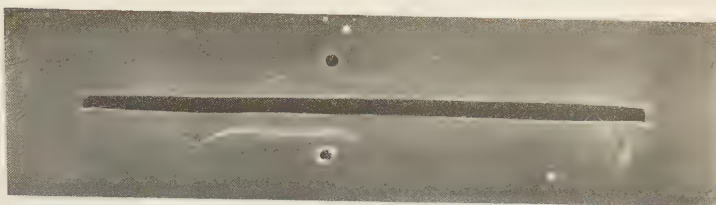
Fibrinogen

Kaninchen V  
 Fibrinogen (Nr. 628) i. v.  
 Serum vom 1.6. (8 Tage post reinjectionem<sub>1</sub>)  
 $\gamma$ -Globuline       $\alpha_2$ -Makroglobuline

Rinder Serum

Antifibrinogen  
 serum

Rinderfibri-  
 nogen



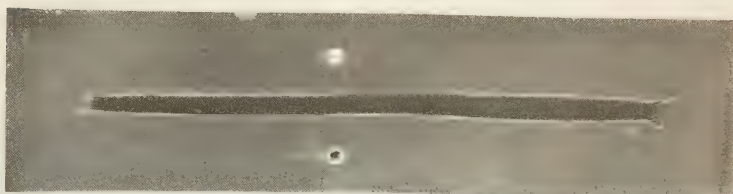
Fibrinogen ?

Serum vom 24.7. (13 Tage post reinjectionem<sub>3</sub>)  
 ?

Human Serum

Antifibrinogen  
 serum

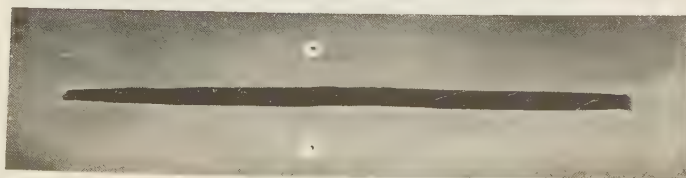
Humanfibri-  
 nogen



Rinder Serum

Antifibrinogen-  
 serum

Rinder-  
 fibrinogen



Fibrinogen

Kaninchen VIII

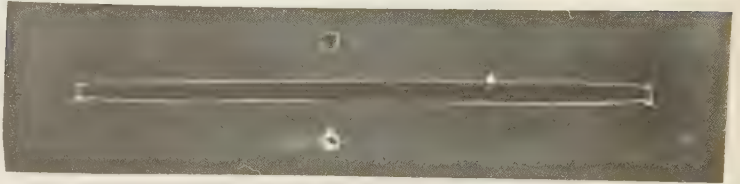
Solufibrin<sub>7</sub> (Nr. 637 A) s.c.

Serum vom 27.6. (5 Tage post  
reiniectio<sub>7</sub>nem)

Humanserum

Antisolufibrin<sub>7</sub>serum

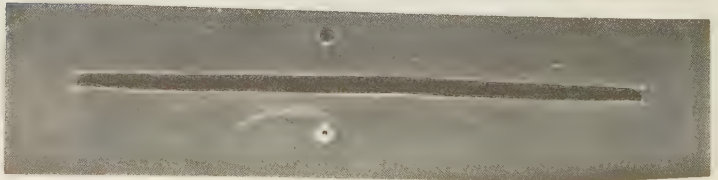
Humanfibrinogen



Rinder<sub>7</sub>serum

Antisolufibrin-  
serum

Rinderfibri-  
nogen



Fibrinogen

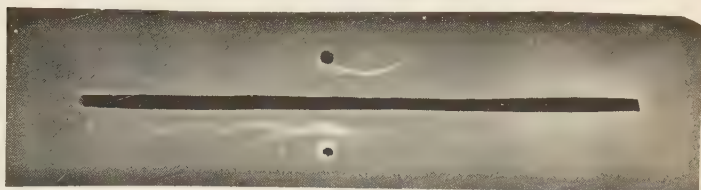
2

Kaninchen X  
Fibrinogen (Nr. 637 A) i. v.

Serum vom 17.7. (6 Tage post reiniectionem<sub>2</sub>)

$\gamma$ -Globulin  $\gamma_1$ -Makroglob.  $\alpha^2$  Makroglobulin

Rinderserum  
Antifibrinogen-  
serum  
Rinderfibrinogen



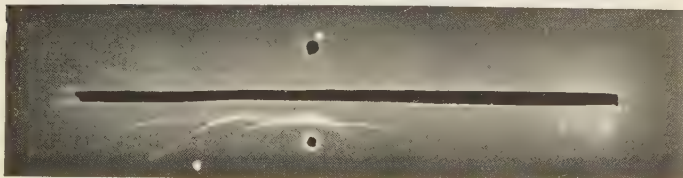
$\gamma$ -Globulin Fibrinogen ?

Kaninchen XI  
Solufibrin<sub>6</sub> (Nr. 637 A) i. v.

Serum vom 17.7. (6 Tage post reiniectionem<sub>2</sub>)

$\gamma$ -Globulin

Rinderserum  
Antisolu fibrin-  
serum  
Rinderfibri-  
nogen



$\gamma$ -Globulin Fibrinogen ?

### Der Nachweis der verwendeten Antigene

Die Untersuchung der gewonnenen Sera auf ihre Ak-Haltigkeit, wie sie bereits beschrieben wurde (s. S. 10), läßt sich - bei gesichertem Antikörpergehalt des Serums - in Umkehrung der Zielsetzung zum Nachweis des Antigens oder immunologisch gleichartiger Substanzen verwenden.

Dabei entstanden mit Solu-Fibrin - entsprechend den drei in der Ultrazentrifuge festgestellten Komponenten - meist 3 Präzipitationslinien, während sich mit Fibrinogen - frisch zubereitet - nur eine Linie ergab (vergl. S. 74).

Mit Sequestren oder Thrombin, welche zur Solu-Bereitung verwendet wurden, konnte niemals ein positives Ergebnis erzielt werden.

Der Nachweis der angewendeten Antigene war wichtig, wenn es darum ging zu bestimmen, wo und wie lange Solu-Fibrin (Fgen) im Blut der Versuchstiere kreist.

Auch der Nachweis eines weitgehenden Abbaus von Fibrin im Falle des Trypure-Solu konnte am negativen Ausfall der Probe erkannt werden.

Während Citratplasma und Serum vom normalen, nicht injizierten Tier in keinem Fall (es wurde 25 x untersucht) einen positiven Ausfall mit unseren Antiseren ergab, war es uns möglich, bei stark heparinisierten Tieren (XVI, XVIII), gewisse Zeit nach der Solugabe positive Ergebnisse zu erzielen.

Tier XVI wurde sehr rasch getötet und sezziert, so daß etwa 15 Min. nach der Soluinjektion bzw. 10 Min. nach dem Tod flüssiges Blut aus dem rechten Vorhof, dem linken Vorhof, der Aorta descendens und der Vena cava inferior abgenommen werden konnte.

Die durch Zentrifugieren gewonnenen Heparinplasmen erwiesen sich alle als antigenhaltig.

Bei den Entnahmen "intra vitam" beim ebenfalls heparinisierten Tier XVIII ergaben die unmittelbar nach der Injektion von Solu sowie die nach 7 und 15 Min. gewonnenen Heparinplasmen positive Ausfälle, während die nach 30, 50, 80, 120 Min. entnommenen Proben keine Präzipitation mehr ergaben.

Um auch eine eventuell durch das Heparin bewirkte Fibrinogenolyse (-es könnte ja sein, daß unsere Antisera, wenn auch nicht gegen Kaninchenfibrinogen - Citratplasma, so doch gegen Abbauprodukte desselben reagierten -) als Ursache des positiven Ausfalls mit den post Inj. gewonnenen heparinisierten "Sera" (Plasmen) auszuschließen, muß noch erwähnt werden, daß Plasma

von Tier XVIII, nach der Heparin-gabe gewonnen (also fibrinogen- und heparinhaltig), keine Präzipitation ergab.

Desgleichen waren alle Tests mit Sera vor, während oder nach der Injektion von Solu-Fibrin aus nicht heparinisierten Tieren gewonnen, negativ. Die Entnahmen nach einer längeren Zeit als 7 Min. post Inj. (Solu) gestalteten sich immer schwierig, da die Venen kollabiert waren.

Mit Plasma von Tier V (Fibrinogen), 5 Min. nach der Injektion entnommen, erhielten wir positive Ausfälle, während das Serum des Tieres keine Präzipitationen entstehen ließ. Vermutlich wurde das Rinderfgen zu Fb umgewandelt im Gerinnsel includiert, während Fb-Monomeren (etwa bei der Retraktion) ausgepreßt werden (s. S. 119).

Besonderer Erwähnung verdient die Tatsache, daß aus im Herzen (Tier VI) bzw. in der Lunge (Tier XIX) gefundenen Gerinnseln hergestellte Lysate<sup>+)</sup> , gegen das antikörperhaltige Serum von Tier III getestet, einen eindeutig positiven Ausfall ergaben.

Zur Kontrolle wurden Gerinnsel aus Normal-Hasenblut und solche aus frisch mit inkubiertem Solu injizierten nichtkollabierten getöteten Tieren in gleicher Weise untersucht, was jedoch in keinem Fall zu einem positiven Testergebnis führt.

### Zusammenfassung:

Normalerweise war es nicht möglich, aus dem strömenden Blut p. Inj. das Solu-Fibrin nachzuweisen, sei es, daß die resynthetisierten Mikrogerinnsel sich in den Kapillaren niederschlugen, oder daß sie sehr rasch aufgelöst wurden.

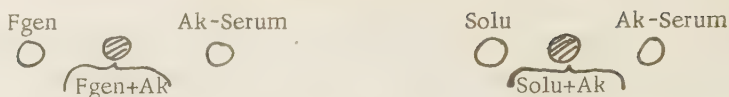
Demzufolge deuten die positiven Ergebnisse bei den heparinisierten Tieren daraufhin, daß das Heparin in den angewendeten Dosen (50 mg/kg Körpergewicht) in vivo die Resynthese hemmt und bzw. oder aber in den verwendeten Dosen die Lysis fördert bzw. das Abfangen im RES hintanhält, wenigstens für die Zeit von 5 Min. in vasis und darnach auch in vitro. (Die im Teil I beschriebenen Experimente in vitro konnten keine sichere Entscheidung bringen.)

Fibrinogen ließ sich nach der Injektion (5-10 Min.) aus dem strömenden Blut nachweisen.

Besonderer Erwähnung bedarf noch die Tatsache, daß das Trypure-Solu mit den Antifibrin-Sera keinen Niederschlag ergab. Der fermentative Abbau war wohl sehr weit gegangen (u. U. bis zu Aminosäuren), was auch die mangelnde Antikörperbildung von Tier XII erklären könnte (s. S. 95).

+) siehe Fußnote nächste Seite

Von Interesse ist noch folgender Versuch:



Im mittleren Loch war Fibrinogen bzw. Solu-Fibrin mit antikörperhaltigem Serum in verschiedenen Verhältnissen gemischt worden. In einem der benachbarten Stanzlöcher befand sich Antigen, im anderen Antiserum.

Die Tatsache, daß nur zwischen Antigen-Antikörper-Gemisch und Antiserum eine Präzipitationslinie auftrat, weist darauf hin, daß die Antikörper im Gemisch aufgebraucht wurden (es zeigte sich auch ein Präzipitat in der mittleren Vertiefung), während das Antigen im Überschuß vorhanden war.

Wurden nur kleine Mengen von Solu-Fibrin dem Gemisch zugesetzt, so kam es auch mit dem Antiserum zu keiner Ausfällung mehr. Dies ist in etwa ein Bild für die durch die Inkubation von Solu mit antikörperhaltigem Citratblut *in vitro* abgelaufene AA-Reaktion. Der Ausfall hängt von der Höhe des Antigen- bzw. Antikörpergehaltes ab. (s. S. 73)

In den getesteten Fällen waren die Antigenmengen (Fibrinogen) größer als der Antikörpergehalt, während die im Solu-Fibrin enthaltene Menge kleiner war. Hierzu muß jedoch bemerkt werden, daß Harnstoff in der relativ hohen Konzentration, wie er sich im Solu-Fibrin befindet, auch die Antikörper zerstört haben könnte, wie es für das Diphtherie-Antitoxin (91) beschrieben ist<sup>++)</sup>.

In Ansätzen, in denen das Verhältnis der Volumina Ak-Serum:Solu > 1 war, also eine Resynthese möglich war (s. S. 39), ist der negative Ausfall der Probe wohl darauf zurückzuführen, daß die RP rascher ablief als die Diffusion im Agar.

<sup>+) (s. S. 82;89) 1) Gerinnsel von XIV im Agarloch mit Harnstoff überschichtet, auch Gerinnsel aus reinem Solufibrin, können, auf diese Weise aufgelöst, zum positiven Ausfall des Geldiffusionstestes führen.</sup>

2) Das Gerinnsel von Tier VI war bei 4°C einer "Nativ-Lysis" überlassen worden.

<sup>++) Während das Fgen-Präcipitat bei 4°C über Wochen erhalten blieb, verschwanden die geg. Solu entstandenen Linien. Der Harnstoff könnte die im AA-Komplex wirksamen elektrostatische Kräfte aufheben (vergl. S. 20) oder die Fibrinkomponente auf fibrinolytischem Wege beseitigen.</sup>

## Der Nachweis von artificiellen Fibrin-Abbauprodukten

Streng genommen gehörte auch Solu-Fibrin in diese Gruppe der in vitro hergestellten Fibrin-Abbauprodukte. Wegen seiner Verwendung als Antigen sollte es jedoch gesondert behandelt werden (siehe oben).

Die Tatsache, daß Human-Fibrinogen, wie es sich im Plasma findet, mit Anti-Rinder-Fibrinogen-Serum bzw. Antiserum gegen Rinder-Fibrin-Abbauprodukte nachgewiesen werden kann, bedarf wegen der Ähnlichkeit der beiden Fibrinogen-Arten (40; 59) keiner näheren Erläuterung.

Auch ein nach Farnley (von R. Marx, J. Rux nach 59b) hergestelltes Nativblut-Lysat<sup>+)</sup>  erwies sich in drei getesteten Fällen als "Ouchterlony positiv".

Da die immunchemischen Untersuchungen auch unternommen wurden, um den "Erfolg" einer Sk-Therapie an den dabei entstandenen Fibrin- bzw. Fibrinogen-Abbauprodukten überprüfen zu können, wurde Sk-abgebautes Fibrin in vitro hergestellt.

Ansatz:        2,3 ccm Citrat-Plasma (MW)  
              100    E Sk (Behring)  
              0,6 ccm  $\text{CaCl}_2$  (1,29 n)

Diese Mischung wurde bei  $37^\circ\text{C}$  zur Gerinnung gebracht (Ger.-Zeit ca. 15 Min.) und dann die Lysis ("Endolyse", 54) abgewartet (L-Zeit ca. 30 Min.). In bestimmten Zeitabständen wurden Proben des Lysats zur Geldiffusion eingesetzt.

### Der Ausfall der immunchemischen Untersuchung

| Test-Ansätze                   | min. nach<br>der Lysis | Ak-Serum III<br>(19 Tg. p. $\text{Re}_1$ ) | Präcipitation nach |         |
|--------------------------------|------------------------|--------------------------------------------|--------------------|---------|
|                                |                        |                                            | 12 Std.            | 48 Std. |
| NaCl                           |                        | "                                          | -                  | -       |
| Cit. Plasma Mensch             |                        | "                                          | +                  | +       |
| 0,02 ccm Pl + 0,005 ccm        |                        | .                                          | .                  | -       |
| Sk + 0,005 ccm $\text{CaCl}_2$ |                        |                                            |                    |         |

---

+) Herstellung des "Farnley-Lysats": In Zentrifugengläsern werden 1,7 ccm Phosphat Puffer, 0,7 ccm Thrombin (=5 E) u. 0,2 ccm Nativvenenblut bei  $0^\circ\text{C}$  zur Gerinnung gebracht. Beim Rotieren zwischen den Handflächen löst sich das Gerinnsel von der Glaswand. Nachdem die Ansätze 30 Min. bei  $4^\circ\text{C}$  gehalten wurden, werden sie im Wasserbad ( $37^\circ\text{C}$ ) zur Lysis gebr.

| Ansatz s. S. 114, Zeile 16 | min nach<br>d. Lysis | Ak-Serum III<br>(19 Tg. p. Re <sub>I</sub> ) | Präcipitation nach<br>12 Std. | 48 Std. |
|----------------------------|----------------------|----------------------------------------------|-------------------------------|---------|
| Ansatz s. S. 114, Zeile 16 | 5'                   | "                                            | +                             | -       |
| "                          | 10'                  | "                                            | +                             | -       |
| "                          | 30'                  | "                                            | +                             | -       |
| "                          | 60'                  | "                                            | +                             | -       |
| "                          | 3 Std.               | "                                            | +                             | -       |
| "                          | 5 Std.               | "                                            | (+)                           | -       |
| "                          | 15 Std.              | "                                            | -                             | -       |
| "                          | 24 Std.              | "                                            | -                             | -       |

Ergebnis: Die Fibrin-Abbauprodukte, wie sie unter Sk-Wirkung entstehen, sind bei einer Inkubationsdauer von 5 Std. gerade noch nachweisbar. Längere Einwirkung des Fibrinolytin-Aktivators läßt Abbauprodukte entstehen, die sich dem immunchemischen Nachweis entziehen.

Das Verschwinden der Immunpräzipitate, nachdem die Testplatte 48 Std. bei 37°C gehalten worden war, muß als Proteolyse auf Sk-Basis gedeutet werden.

Der Versuch wurde wiederholt, wobei jedoch vor Einsetzen des Lysats jedes Loch mit 0,005 ccm Trasylol (5 E Trasylol/1,5 E Sk) beschickt wurde. Das Ergebnis nach 12 Std. war genau dasselbe; die Linien waren aber auch am folgenden Tag noch deutlich sichtbar.

Es wurde auch versucht, ein fertiges Gerinnsel aus recalcifiziertem Citrat-Plasma hergestellt, in Sk zu lösen ("Exolyse") (59).

Zwei Plasmen kamen zur Verwendung:

- 1) Cit. Plasma M. W. (7. Tg. der Menstruation)
- 2) Cit. Plasma Sch. (2 Tg. p. partum - unstillbare Blutungen -)

| Ansatz:                | 1)<br>M. W. |     |             | 2)<br>Sch. |     |             |
|------------------------|-------------|-----|-------------|------------|-----|-------------|
| 0,3 ccm Cit. Plasma    | Ger. Zeit   | L-Z | Ouchterlony | Ger. Z.    | L-Z | Ouchterlony |
| 0,3 ccm CaCl (1,25)    |             |     |             |            |     |             |
| in 0,6 ccm Sk (=600 E) | 24-38'      | 18' | ++          | 15'        | Ø   | -           |

Die fehlende Lysis des Gerinnsels der Patientin Sch. könnte auf einer vorangegangenen Hyperkonsumption von Plasminogen und der massiven hämostatischen Behandlung beruhen oder aber auch auf einem sehr hohen ASL-Titer.

Die langsame Gerinnung und die für die Exolyse überraschend kurze

L-Zeit von 18 Min. sprechen für eine Hyperfibrinolyse im Falle M.W.<sup>+)</sup> .  
Im Gelddiffusionstest entstanden zwei Präzipitationslinien.

Da das Serum während der Menstruation entnommen worden war, kam der Verdacht auf, daß es sich um eine Hyperfibrinolyse intra menstruationem handeln könnte, was zu einer Reihe von Versuchen auch mit anderen Probandinnen Anlaß gab.

#### Untersuchungen von Venen-Blut intra menstruationem:

| "Sera":                                                                                                | F. ♂             | L. A. | A. B. | A. M. | A. W. | M. W. <sup>+) </sup> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|----------------------|
| 1) 0,2 ccm phys. NaCl ad 2 ccm Blut                                                                    | O <sup>++)</sup> | -     | -     | -     | O     | + - O                |
| 2) 0,2 ccm Sk " "                                                                                      | +                | +     | +     | +     | +     | +                    |
| 3) 0,2 ccm Trasylol " "                                                                                | O                | ?     | -     | +     | O     | - O                  |
| 4) 2,3 ccm Plasma + 100E Sk<br>+ 0,6 ccm CaCl <sub>2</sub>                                             |                  | +     |       | ++    |       | ++                   |
| 5) 0,4 ccm Nat. Cit. ad 2 ccm Blut                                                                     | +                | +     | +     | +     | +     | +                    |
| 6) 0,2 ccm Urokinase ad 2 ccm "                                                                        | +                | /     | /     | /     | +     | /                    |
| 7) "Exolysat": (0,3 ccm Pl.<br>+ 0,3 ccm CaCl <sub>2</sub> ) in 0,6 ccm Sk                             |                  | +     | +     |       |       | +                    |
| 8) "Kunstserum": (0,3 ccm Pl.<br>+ 0,3 ccm CaCl <sub>2</sub> ) Fb extrahiert                           | -                | -     | -     | -     | -     | +                    |
| 9) "Euglobuline": (0,5 ccm Cit. Pl.<br>+ 8 ccm A. dest + 0,5 ccm Essig-<br>säure in 0,5 ccm phys. NaCl |                  |       |       | +     |       | +                    |

+) siehe Fußnote unten

++) Kreisförmige Präzipitation um das testsubstanzhaltige Stanzloch.

Ergebnis. Eine früher beobachtete Spontanfibrinolyse während der Inkubation von Nativ-Blut bei 37°C über 60 Min. ließ sich nicht mehr eindeutig reproduzieren. Die positiven Ausfälle der Proben 2, 4, 6 und 7 sind proteolytisch (Sk bzw. Urokinase) bedingt; die Präzipitationen in den Versuchen 5 und 9 beruhen auf dem Fibrinogen-Gehalt des Systems.

Wie im Ansatz 6 bereits angedeutet, wurde auch Urokinase als Fibrinolyseaktivator verwendet.

Da bei eventueller "Sk-Resistenz" (hoher ASL-Titer) oder Sk-Allergie die Anwendung dieses Fibrinolysin-Aktivators kontraindiziert ist (54; 85e) und somit die Anwendung der Fibrinolysokinase Urokinase in Frage kommt,

+) Zur Probandin M. W. sei bemerkt, daß einmal am 7. Tag d. Menstruation entnommenes Nativ-Serum (60 Min. bei 37°C gehalten) mit Serum vom Kan. III eindeutig positiv reagierte.

wurde folgender Versuch gemacht:

Die Nachweisbarkeit von urokinasegelösten Plasmagerinneln:  
(siehe nächste Seite)

Ansatz: 0,1 ccm Cit. Plasma  
0,1 ccm Kunstserum  
0,1 ccm Urokinase (n E/ccm)  
0,5 ccm  $\text{CaCl}_2$  (m 1,29)

Siehe Tabelle S. 118

Ergebnis: Urokinase-abgebautes Fibrin läßt sich bis zu den nach 2 Std. erreichten Abbaustufen mit dem Antifibrin-Monomeren-Serum von Tier III nachweisen. Auch fiel das Verschwinden der Präzipitationslinien auf (Fibrinolyse!).

Das Antifibrinogen-Serum von Tier V war zum Nachweis des mit Urokinase abgebauten Fibrins nicht geeignet.

Dies bedeutet wohl, daß die immunchemische Breite von Anti-Solufibrin-Serum bei unseren Versuchen größer war als die von Antifibrinogen-Serum.

Aus der mangelnden Spezifität der Antisera ergaben sich einige Probleme.

Die Tatsache, daß mit Anti-Rinder-Solu-Fibrin-Serum auch Human-Fibrinogen ausgefällt werden kann, macht es notwendig, den Nachweis von Fibrin-Abbauprodukten nicht im Plasma, sondern nur im fibrinogenfreien Serum zu führen.

Dies wirft die Frage auf, ob Fibrin-Monomeren im Serum verbleiben oder aber vom Fibrin-Gerinnsel adsorbiert werden, so daß die Suche danach vergebens wäre.

Um dies zu klären, müßte in einem Fibrin-Lysat ein Gerinnsel entstehen und extrahiert werden.

Bleiben harnstoffgelöste Fibrin-Monomeren trotz Gerinnselbildung und Herausnahme bzw. Abzentrifugieren der Fibrinfasern im Überstand nachweisbar?  
(siehe Seite 119)

Ansatz I: 0,1 ccm Cit. Plasma }  
0,1 ccm  $\text{CaCl}_2$  (m 40) } 15" + 0,2 ccm Solu<sub>n</sub>

Ansatz II: 0,1 ccm Cit. Plasma }  
0,05 ccm Thrombokinase } 15" + 0,2 ccm Solu<sub>n</sub>  
0,1 ccm  $\text{CaCl}_2$  (m 40) }

Ansatz S 117.4 Z.)

| 0,1 ccm Urokinase / ccm                                                       | 500 E         | 100 E         | 50 E          | 10 E          |
|-------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Lysis - Zeit                                                                  | 6'            | 6' 30"        | 10'           | 120'          |
| Präzipitation im Geldiffusionstest gegen Ak von Tier III (5 Tg. post. re III) |               |               |               |               |
| Lysis - Stop <sup>*)</sup> nach min/Std.                                      | Std. Std. 4°C | Std. Std. 4°C | Std. Std. 4°C | Std. Std. 4°C |
| 5'                                                                            | 12 45 7 Tg.   | 12 45 7 Tg.   | 12 45 7 Tg.   | 12 45 7 Tg.   |
| 15'                                                                           | - - -         | - - -         | - - -         | - - -         |
| 30'                                                                           | - - -         | - - -         | - - -         | - - -         |
| 60'                                                                           | - - -         | - - -         | - - -         | - - -         |
| 90'                                                                           | - - -         | - - -         | - - -         | - - -         |
| 120'                                                                          | - - -         | - - -         | - - -         | - - -         |
| 13 Std.                                                                       | - - -         | - - -         | - - -         | - - -         |
| 20 Std.                                                                       | - - -         | - - -         | - - -         | - - -         |

\*) "Lysis - Stop" durch Zusatz von Trasylol (Trasylol/Urokinase = 1:5)

"Leerversuche"

Ansatz I

Ansatz II (s. S. 117)

Geldiffusionstest nach Ouchterlony mit Antisera von Kaninchen III

Präzipitation nach: n-Strd.

|                                         | 15 | 30 | 48 |                            | 15 | 30  | 48 |                           | 15 | 30 | 48 |
|-----------------------------------------|----|----|----|----------------------------|----|-----|----|---------------------------|----|----|----|
| 1) Solu <sub>6</sub> (35 Tg. b. 4°C)    | +  | +  | +  | (mit Solu aus Leervers. 1) |    | (+) | +  | (mit Solu aus L. vers. 1) |    |    | +  |
| 2) Solu <sub>6</sub> (35 Tg. b. 20°C)   | ?  | +  | +  | " " " 2                    | ?  | +   | +  | " " " 2                   | +  | +  | +  |
| 3) Solu <sub>1</sub> (35 Tg. b. 20°C)   | ?  | +  | +  | " " " 3                    |    | +   | +  | " " " 3                   | ?  | +  | +  |
| 4) Solu <sub>6</sub> (100 Tg. b. -20°C) | ?  | +  | +  | " " " 4                    | +  | +   | +  | " " " 4                   | +  | +  | +  |
| 5) Fgen                                 | +  | +  | +  | " " " 5                    | -  | -   | -  | " " " 5                   | -  | -  | -  |
| 6) NaCl                                 | -  | -  | -  | " " " 6                    | -  | -   | -  |                           |    |    |    |
| 7) Cit. Plasma                          | +  | +  | +  |                            |    |     |    |                           |    |    |    |

Ergebnis Das im Solu entstandene harnstoff-unlösliche Gerinnsel aus I 0,1 cem Cit. Plasma + 0,1 cem CaCl<sub>2</sub>, und II. 0,1 cem Cit. Plasma + 0,05 cem Th + 0,1 cem CaCl<sub>2</sub> (also Ca<sup>++</sup> und FSF-haltig) hat die Fibrin-Monomeren nicht absorbiert, sie blieben im "Rückstand" nachweisbar.

Es soll auch noch untersucht werden, ob Sk-gelöstes Fibrin mit dem Gerinnsel entfernt wird.

Ansätze:

| Ansätze:                                                         |                                  | Immun - Diffusion |         |
|------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------|---------|
|                                                                  |                                  | nach<br>24 Std.   | 60 Std. |
| 1) Citrat Plasma MW                                              |                                  | +                 | +       |
| 2) Rinder Fgen (1 %ig)                                           |                                  | +                 | +       |
| 3) 0,46 ccm Cit. Pl. + 0,14 ccm Sk<br>+ 0,12 ccm $\text{CaCl}_2$ | Gerinnsel entfernt:<br>Rückstand | +                 | +       |
| 4) Gerinnsel aus 3                                               | Lysis in NaCl:<br>Lysat          | +                 | +       |
| 5) Gerinnsel aus 3                                               | Lysat (nach 15' Trasytol-Zusatz) | +                 | +       |
| 6) Lysat <sup>+</sup> aus 5+Plasma + $\text{CaCl}_2$             | Gerinnsel entfernt:<br>Rückstand | +                 | +       |
| 7) Lysat <sup>++</sup> aus 5 + Plasma + $\text{CaCl}_2$          | Gerinnsel entfernt:<br>Rückstand | +                 | +       |
| 8) Gerinnsel aus 6 in phys. NaCl                                 | "partielle" Lysis:<br>Lysat      | (+)               | -       |
| +) Lysat 15' nach der Lysis                                      | ++) Lysat 30' nach der Lysis     |                   |         |

Ergebnis: In der gewählten Versuchsanordnung wird der Gehalt des Sk-Fibrin-Lysats an Fibrin-Abbauprodukten durch die Extraktion eines Gerinnsels nicht merklich verringert. Fibrin-Abbauprodukte müssten sich prinzipiell also aus Patienten-Serum nachweisen lassen, wenn auch ein Teil durch Adsorption am polymerisierenden Fibrin verloren geht.

#### Zusammenfassung:

Mit den - besonders vom Tier III - gewonnenen Anti-Fibrin-Monomeren-Sera war es möglich, nicht nur Rinder- und Human-Fibrinogen, sondern auch in vitro erzeugte Fibrin-Abbauprodukte der beiden Species nachzuweisen, solange sie eine gewisse Molekülgröße nicht unterschritten.

Die untersuchten Fibrin-Abbauprodukte waren:

Harnstoffgelöstes Rinder-Fibrin,

Nativ (Plasmin-) Lysat vom Menschen,

Sk-gelöstes Human-Fibrin und

Urokinase-gelöstes menschliches Fibrin.

Der Nachweis von Fibrinabbauprodukten therapeutischer bzw. patho-physiologischer Genese

Den im vorangehenden Kapitel beschriebenen Versuchen in vitro zufolge, müsste auch der immunochemische Nachweis von in vivo entstandenen Fibrin-Abbauprodukten möglich sein.

Bei genormten Versuchsbedingungen (Beschaffenheit der Agarplatte, Abstand der Stanzlöcher, Temperatur- und Inkubationszeit) ist der positive Ausfall der Probe außer vom Antikörpergehalt des Serums in hohem Maße von der Konzentration des Antigens - in unserem speziellen Fall von der Zahl der Fibrinbruchstücke - abhängig.

Es war also die Frage, ob die Empfindlichkeit des Geldiffusionstestes ausreicht, um die in vivo vorkommenden Konzentrationen von Fibrin-Abbauprodukten sichtbar zu machen.

#### Fibrin(ogen)-Abbauprodukte im Blut unter antithrombotischer Therapie

Bei einer erfolgreichen Behandlung intravasaler Gerinnungsvorgänge mit Fibrino(geno)lytica könnten sich Fibrin-Abbauprodukte im Kreislauf befinden.

Da eine große Anzahl von Patienten bei uns unter Dauer-Antikoagulantien-Therapie steht, sei es Sintrom, Marcumar oder Indaliton, wurde zunächst Nativ-Serum (ohne Trasylol) eines Patienten (S. T.) untersucht, der wegen einer Beinvenen-Thrombose mit Sintrom auf einen Prothrombin-Index von 30 % eingestellt war.

Die immunochemische Untersuchung erbrachte kein positives Ergebnis.

Im Falle einer Lungenembolie (Patient N.), die mit Heparin (vergl. S. 126) behandelt wurde, zeigte sich erst nach 48 Stunden eine schwache Präzipitationslinie zwischen dem Patienten-Serum (ohne Trasylol) und dem Anti-Serum, die jedoch nach weiteren 20 Stunden nicht mehr eindeutig erkannt werden konnte.

Ein Verschuß der Beinarterie mit Gangrän der großen Zehe auf arteriosklerotischer Grundlage (Patient N.) wurde mit Sk-Infusionen und s. c. Heparin-gaben behandelt.

Um ein Weiterwirken der Sk in vitro zu verhindern, wurde nach R. Marx zur Blutentnahme Trasylol vorgelegt (100 E/ccm). Zweimal konnten wir dabei einen schwach positiven Ausfall der immunochemischen Untersuchung registrieren, zweimal war das Ergebnis jedoch zweifelhaft bis negativ (s. S. 124, 125).

Da sich in der Zeit, in der die antikörperhaltigen Sera zur Verfügung standen, keine Gelegenheit ergab, eine massive Thrombose fibrinolytisch anzugehen, können keine weiteren Versuchs-Ergebnisse beschrieben werden.

Ergebnis: Die Nachweisbarkeit von Fibrin-Abbauprodukten therapeutischer Genese konnte von uns in den behandelten Fällen nicht eindeutig<sup>†)</sup> gesichert werden.

Das Auftreten von pathologischen Fb-Abbauprodukten in vivo wird von Stirnemann (80) für den Schock ganz allgemein, von Lasch und Krecke (85g) beim Saranelli-Shwartzman-Phänomen angenommen.

Hyperfibrinolyse als Folge einer progressiven oder latenten Plasminaktivierung bei Thrombokinas-Intoxikation gibt Heimbürger (34) bei vorzeitiger Placenta-Lösung, totem Foetus, Prostata-Carcinom und Thorax-Operationen an. Eine Zunahme der fibrinolyt. Aktivität beschreibt Winkelmann (87) für alle Fälle von extrakorporalem Kreislauf. Eine Spontan-Fibrinolyse

†) H. Behring, Marburg, hat uns brieflich (15. 12. 62) mitgeteilt: "Wir haben in zahlreichen Fällen inzwischen nachweisen können, daß im Serum von mit Streptokinase behandelten Patienten immunologische Fibrin- bzw. Fibrinogen-Abbauprodukte nachweisbar sind."

größeren Ausmaßes erwähnt Sandritter (64) nur für 0,5 % der von ihm beobachteten Fälle.

Im Elektronen-Mikroskop (1) sowie mittels Strömungsdoppelbrechung (80) geführte Nachweise von Fb(Fgen)-Abbauprodukten ex vasis sind uns bekannt, nicht aber immunologische Untersuchungen auf Fb-Bruchstücke patho-physiologischer Genese.

Wir haben mittels Geldiffusion im Punktat eines subduralen Hämatoms (Kind M., Universitäts-Nervenklinik, München) Fb-Abbauprodukte nachgewiesen.

Zwei Arten von Punktionsblut wurden von Dr. K. Decker, München, zur Bestimmung der Gerinnungsfaktoren überwiesen;

Die eine Probe war ungerinnbar (1a u. b; 2a u. b), die andere gut durchgeronnen (1c u. 2c).

Nach Ausschluß einer Koagulopathie im Venenblut, sowie einer Antithrombinwirkung des Hämatomblutes wurden Proben mit (2a u. 2b) und ohne Thrombokinase (1a; 1b) vom ungeronnenen sowie Serum des geronnenen Punktates nach Ouchterlony getestet.



Ergebnis: Ein subdurales Hämatom (ungerinnbares Punktat (1a u. b) enthielt Fb(Fgen)-Abbauprodukte.

Der Gehalt des normal geronnenen (c), wohl aus einer frischen Nachblutung stammenden Blutes an immunologisch nachweisbaren Fb-Bruchstücken erklärt sich aus der Durchmischung mit dem restlichen Hämatom-inhalt.

Die fibrinol. Aktivität der Hirnhäute ist wohl sehr stark. Sie zu hemmen (Trasyolol in die Hämatomhöhle) könnte die Gefahr einer Nachblutung herabsetzen. Es ist jedoch zu bedenken, daß damit die Abräumung gehemmt wird und eine größere Narbe restieren könnte.

Wir konnten auch - unseres Wissens zum erstenmal - im Falle einer Thrombokinas-Intoxikation bei der Plazenta-Lösung Fibrin- bzw. Fibrinogen-Abbauprodukte im Serum durch Geldiffusion nachweisen.

Nach Lösen der Cervix-Plazenta kam es bei der Pat. Ko. (I. Frauenklinik der Universität München) zu unstillbaren Blutungen ex utero. Da der hämorrhagische Schock trotz Transfusionen und Injektionen von Fibrinogen andauerte, musste die Blutungsquelle durch Extirpation des Uterus entfernt werden (vergl. Gross (26) ).

Das 4 Std. nach der Operation entnommene Nativvenenblut zeigte normale Gerinnung, während das post partum aus dem Uterus aufgefangene Blut auch nach 24 Std. keinerlei Gerinnselbildung aufwies.

Das Venen-Blut wurde, wie üblich, 60 Min. bei 37° C gehalten, dann abzentrifugiert.

Das so gewonnene Serum - es war frei von gerinnbarem Fgen, da auf Th-Zusatz kein Gerinnsel entstand - ergab in 25 zu verschiedenen Zeiten und mit verschiedenen Anti-Seren von "Solu-Kaninchen" einen positiven Ausfall des Geldiffusionstestes. Der Gehalt an Fgen- oder Fb-Abbauprodukten wurde auch von H. E. Schultze (Behringwerke) bestätigt. (s. S. 127).



↓ = Serum v. Kanin. III (6 Tg. post re<sub>2</sub>)

- |                               |     |                 |
|-------------------------------|-----|-----------------|
| 1) Rinderfgen                 | +   |                 |
| 2) Solu <sub>6</sub>          | 2+  |                 |
| 3) Serum Ko                   | +   |                 |
| 4) Hasenpl.                   | -   |                 |
| 5) Ser. N. (nach Sk-Infusion) | (+) | (vergl. S. 122) |

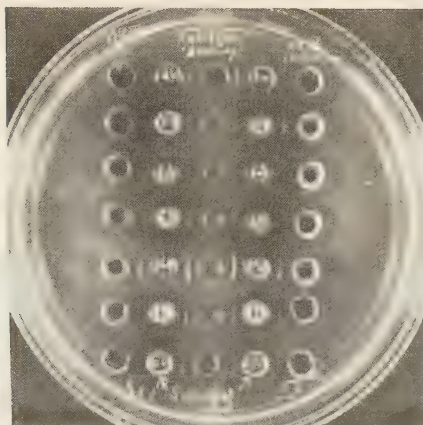
Daß das aus dem Uterus-Blut (post partum) der Pat. gewonnene Serum ebenfalls einen positiven Ausfall ergab, ist leicht zu verstehen.

Daß dies aber auch für normales Menstruations-Blut gilt, konnten wir in acht von uns untersuchten Fällen nachweisen. Um eine nachträgliche Fibrinolyse in vitro oder auch ein Vorhandensein von Fgen auszuschalten, wurden Proben des M.-Blutes möglichst frisch mit Trasylol und Thrombin (bzw. Thrombokinase) versetzt, 60 Min. inkubiert und dann scharf abzentrifugiert.

Immunchemische Untersuchung des aus M-Blut gewonnenen "Succus"

|                          |        | L. A. | L. P. | A. B. | E. V. | T. M. | H. H. | A. W. | M. W. | Ko <sup>+) </sup> |
|--------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------|
| Menstruations-           |        |       |       |       |       |       |       |       |       |                   |
| blut                     | Succus | +     | +     | +     | +     | +     | /     | +     | +     | +                 |
| 1 ccm M-Blut +           |        |       |       |       |       |       |       |       |       |                   |
| 0,2 ccm NaCl             | /      | /     | +     | /     | /     | /     | /     | +     | +     |                   |
|                          | Succus |       |       |       |       |       |       |       |       |                   |
| 1 ccm M-Blut +           |        |       |       |       |       |       |       |       |       |                   |
| 0,2 Th 60 E              | +      | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +                 |
|                          | Succus |       |       |       |       |       |       |       |       |                   |
| 1 ccm M-Blut +           |        |       |       |       |       |       |       |       |       |                   |
| 0,2ccm Trasylol          | /      | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +                 |
| 200 E                    | Succus |       |       |       |       |       |       |       |       |                   |
| 1 ccm M-Blut +           |        |       |       |       |       |       |       |       |       |                   |
| 0,2ccmThrombo-           | /      | /     | +     | /     | /     | /     | /     | /     | +     |                   |
| kinase+CaCl <sub>2</sub> |        |       |       |       |       |       |       |       |       |                   |
|                          | Succus |       |       |       |       |       |       |       |       |                   |

+) "Succus" von ungerinnbarem Blut ex utero post partum



Ergebnis: Der während der Menstruation gewonnene "Succus" erwies sich in allen Fällen als fibrinbruchstückhaltig.

Daß eventuell noch vorhandenes Fibrinogen durch das zugesetzte Thrombin sicher ausgefällt worden wäre, da keine wesentliche Hemmung durch Antithrombin geschah, wurde wie folgt erwiesen:

- 1) 0,15 ccm Cit Plasma  
     0,05 ccm phys. NaCl                      Ger. Zeit 15"  
     0,2 ccm Thrombinlösung
- 2) 0,15 ccm Cit Plasma  
     0,05 ccm "Succus"                      Ger. Zeit in 10 Parallelversuchen  
     0,2 ccm Th-Lösung                      zwischen 14" und 17"

Ganz ähnliche Ergebnisse zeigte die Untersuchung (s. S. 127) der unter Vorlage v. 200 E Trasylol/ccm Blut gewonnenen Sera des Patienten M. (Chir. Universitätsklinik, München).

Nach Anschluß der Herz-Lungen-Maschine<sup>+)</sup>  war es zu einer therapeutisch (Polybren, Cohn-Fraktion, Plasma, Blut-Transfusion) nicht beeinflussbaren Ungerinnbarkeit des Blutes gekommen. Die Ursache war eine durch High-land-Schnelltest erwiesene (Hypo→) Afibrinogenämie, bei Ausschluß einer Antithrombinwirkung.

Ein mit Thrombin nicht ausfällbarer Fibrin (Fibrinogen-)-Körper wurde immunoelektrophoretisch nachgewiesen: (s. S. 127)

<sup>+)</sup>  Untersuchungen von Patienten-Sera, während Thoraxchirurgischer Eingriffe gewonnen, werden derzeit von R. Marx u. U. Schäfer, Mü., durchgeführt.

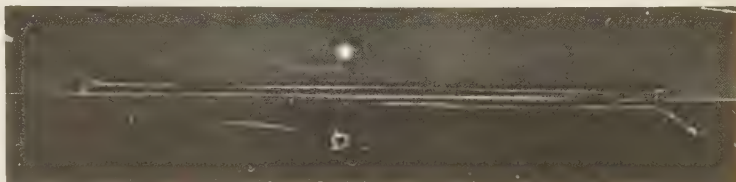
# Immunelektrophoretischer Nachweis von Fibrin - (Fibrinogen-) Abbauprodukten

1.) im Serum der Patientin ko.  
Fibrinogen

Normalplasma

Fibrinogenserum  
kaninchen

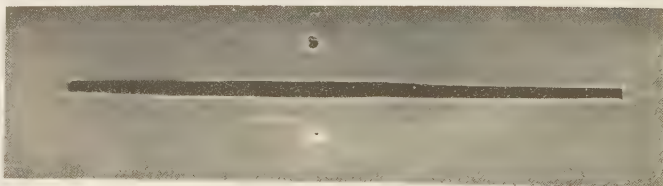
Serum ko



(Fibrinogen)  
2.) im Serum - Plasma des Patienten M.

Normales  
Humanserum

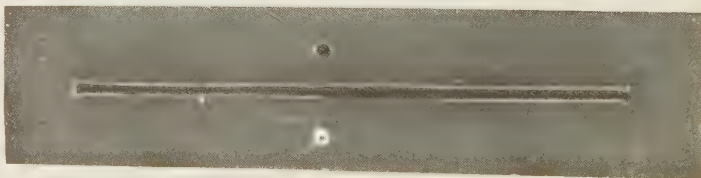
Antifibrinogen-  
serum vom Kan.,  
Op. 268  
Serum M. (I)  
mit Trasylol



Fibrinogen

Normales  
Humanserum

Antifibrinogen-  
serum vom Kan.,  
Op. 268  
Serum M. (II)  
mit Trasylol

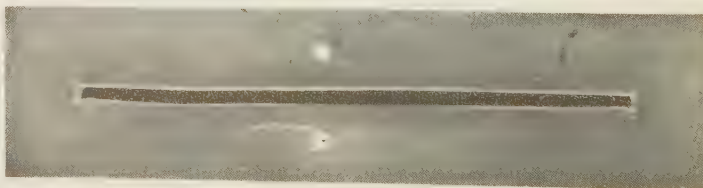


Fibrinogen

Normales  
Humanserum

Antifibrinogen-  
serum vom Kan.,  
Op. 268

Serum M  
mit Trasylol u.  
Thrombin



Fibrinogen

### Zusammenfassung:

Mit Antisera gegen Solu<sub>6</sub> bes. vom Kaninchen III war es möglich, in einem Fall von Thrombokinas-Intoxikation post partum im Serum aus Venenblut Fb-Abbauprodukte nachzuweisen, die nach zusätzlichen gerinnungsphysiologischen Tests (Antithrombin VI im Plasma!) als intravasaler Genese wahrscheinlich gemacht werden konnten.

Das Serum eines Patienten mit einer während der Herzoperation auftretenden Koagulopathie - die Sera M (I und II) waren nach Gabe von Polybren (Heparinantagonist) unter Vorlage von Trasylol gewonnen worden; eine Antithrombinwirkung wurde ausgeschlossen - enthielten ebenfalls immunologisch nachweisbare Fb- bzw. Fgen-Bruchstücke.

Auch der durch Abzentrifugieren aus Menstruationsblut gewonnene "Succus" erwies sich als Fb-Monomeren-haltig. Dies deutet darauf hin, daß das aus der Uterusschleimhaut austretende Blut zunächst gerinnt (Gewebsthrombokinasen) und dann von fibrinolytischen Fermenten aufgelöst wird; eine, wenn auch wenig wahrscheinliche, Fibrinogenolyse ist immunchemisch nicht ausschließbar.

Ist die Fibrinolyse absolut (Fibrinolyseopathie) oder relativ (wegen übermäßigen Blutaustritts aus der Funktionalis) insuffizient (R. Marx), so kommt es zur Ausstoßung von Blutkoageln, wie sie von Patientinnen mit Menorrhagien beschrieben werden.

Wie notwendig es ist, die "Fibrinogen-Freiheit" des Testserums nachzuweisen, zeigt eine Untersuchung, durch deren Ergebnis wir uns zunächst hatten täuschen lassen: Das "Serum" der Patientin R. (I. Med. Klinik d. Universität Mü) mit sehr starker Thrombopenie (Seifenabort), welche zu wiederholten Malen dialysiert werden musste ("Heparinämie"), führte zur Ausbildung sehr starker Präzipitationslinien im Agar-Gel.

Da sich jedoch bei näherer Untersuchung des Plasmas eine fast auf das Dreifache verlängerte Thrombinzeit ergab, wurde dem "Serum" Th zugesetzt, was zur Gerinnungsbildung führte. Das so "defibrinierte" Serum wurde wieder nach Ouchterlony getestet: Es entstand eine kaum mehr sichtbare AA-Reaktion. Da die Th-Zeit beim Mischen von Plasma der Patientin mit normalem Plasma nicht zur Norm zurückkehrte, muß eine Thrombin-Hemmung angenommen werden, so daß auch der zarte Niederschlag nach "Defibrination" durch Fgen bedingt sein dürfte.

Es handelt sich also um einen Fibrinogen-Nachweis im "teilgeronnenen Serum-Plasma" (R. Marx).

## Zusammenfassung

Solufibrin, d. h. aus gereinigtem Fibrinogen und wenig reinem Thrombin hergestelltes Fibrin, das in Harnstoff gelöst und durch Änderung der Konzentration des Lösungsmittels beliebig repolymerisierbar und auflösbar ist, eröffnete verschiedene Möglichkeiten extra- und intravasaler Gerinnungsstudien.

Nach der Beschreibung der angewandten Substanzen und Methoden wurde im ersten Hauptteil der Arbeit die Beeinflußbarkeit der Repolymerisation von in Harnstoff gelöstem Fibrin untersucht unter besonderer Berücksichtigung der direkten Polymeraseaktivität des Thrombins.

Wäre Thrombin eine direkte Polymerase, so dürfte bei intravenöser Injektion von Solufibrin nach Ausschaltung der kleinen Thrombindosen in der Harnstoff-Fibrin-Polymeren-Lösung intravasal keine Fibrin-Polymerisation erfolgen, vorausgesetzt, daß intravasal kein fertiges Thrombin vorkommt. Unsere Versuche sprachen gegen eine direkte Polymeraseaktivität des Thrombins.

Solufibrin wurde zum Studium der Polymerisation der Fibrin-Monomeren bei genügender Herabsetzung der Harnstoffkonzentration unter Einwirkung von Heparin und Heparinoiden untersucht.

Dabei zeigte sich, daß ohne Heparinkomplement die genannten Substanzen die Repolymerisationszeit verlängern. Aber auch die Präsenz von Heparinkomplement im Plasma konnte *in vitro* auch in hohen Dosen die Repolymerisation von Fibrin-Monomeren nicht verhüten.

Die Untersuchungen sprechen ebenso wie die 6-fache Umfällbarkeit und die Repolymerisierbarkeit nach Erhitzen auf 80°C (5 min) gegen die Hypothese einer spezifischen direkten Polymerase-Wirkung des Thrombins, unabhängig von seiner proteolytischen, peptidabspaltenden Wirkung.

Solufibrin führte nach Inkubation mit Citratblut des zu injizierenden Tieres (- zur Inaktivierung des in der Fibrin-Monomeren-Lösung enthaltenen Thrombins -), Kaninchen bei Nichtüberschreitung einer bestimmten Dosis und Geschwindigkeit injiziert, nicht zum Tode, wohl aber bewirkte es in manchen Fällen Kreislaufstörungen mit Erschwerung der Blutentnahme aus der Vene.

Bei der pathologisch-anatomischen Analyse konnten bei einem Teil der Tiere, die die Injektion vertragen hatten, keine sicheren pathologischen Veränderungen, bei einem anderen Teil kleine Infarkte in den Lungen festgestellt werden, was dafür spricht, daß durch intravasale Verdünnung Solufibrin repolymerisiert und mit dem Blutstrom fortgetragen in Endgefäßen

(Kapillarnetz der Lunge (?)) niedergeschlagen wird.

Diese "Fibrinationen" (13) können sich aus den verschiedensten Gründen dem mikroskopischen Nachweis großenteils entziehen.

Wird eine bestimmte Dosis überschritten, so stirbt das Tier an Gerinnselbildung in der Lunge. Es handelte sich unserer Meinung nach in diesem speziellen Fall um eine massive, intravasale Fibrinbildung ohne Thrombinbildung und -wirkung, d.h. um eine von den autochtonen Gerinnungsfaktoren des Tieres unabhängige, gewissermaßen einverleibte, autonome Gerinnung des Injektats.

Dabei werden Thrombozyten vielleicht inkludiert; jedenfalls vermindert sich ihre Zahl im Venenblut, während die plasmatische Gerinnbarkeit, soweit untersucht, im wesentlichen unverändert bleibt.

Die bisher beobachteten histologischen Veränderungen an Herz und Lunge können, soweit überhaupt injektionsabhängig, einerseits als allergische Entzündung, andererseits als Folgen von Mikrogerinnseln in der Herz-Lungenstrombahn gedeutet werden.

Um Cardio-Pulmo-Vasopathien isoliert auf der Basis von vielfachen Fibrinationen zu erzeugen, bedarf es weiterer Untersuchungen mit Iso- und Auto-Solufibrin aus höchst gereinigtem Fibrinogen.

Vorversuche zu diesem Ziel der Erzeugung von Modellkrankheiten durch regionale oder universale, fein dosierbare Fibrinausfällung zu schaffen (R.Marx), war eine der wichtigsten Aufgaben dieser Studie.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß weitere Versuche aussichtsreich sind.

Bei Vorinjektion der Kaninchen mit  $\Delta$ -Heparin konnte auch im peripheren Blut immunchemisch Heterofibrin, wahrscheinlicher ein hochmolekulares Abbauprodukt desselben, nachgewiesen werden.

Es ist daher anzunehmen, daß bei hohem Heparin-Titer im Blut hochmolekulare Abbauprodukte des Solufibrins die Lungenbarriere überschreiten und bis zum weiteren Abbau oder ihrer Phagozytose im reticuloendothelialen oder leukozytären System im Blut verweilen können.

Die mehrfach mit umgefälltem Solufibrin injizierten Kaninchen bildeten, soweit sie großmolekulare Fibrinabbauprodukte erhalten hatten, nach den an sich bekannten Zeiträumen von mindestens 2 Wochen einen hohen Titer von Antirinderfibrin, der sich zugleich auf Humanfibrin erstreckte. Ebenso wurden Human- und Rinderfibrinogen sowie Humanfibrinabbauprodukte (durch Streptokinase oder Urokinase bzw. durch Spontanfibrinolyse entstanden) immunchemisch nach Ouchterlony oder auch immunoelektrophoretisch, kon-

trolliert durch H. E. Schultze, nachgewiesen.

Im Serum eines Falles von Cervixplacenta mit Afibrinogenämie, sowie einer Afibrinogenämie nach Thoraxoperation konnte die intravasale Präsenz von Fibrin oder Fibrinogenabbauprodukten sehr wahrscheinlich gemacht werden; ein Abbauprodukt konnte im Menstruationsblut, wie auch im Punktat eines subduralen Hämatoms nachgewiesen werden.

Es zeigte sich klar, daß von intravasaler bzw. intrakorporaler Fibrin- bzw. Fibrinogenolyse nur gesprochen werden kann, wenn die extravasale Fibrinolyse, insbesondere im Zusammenhang mit Gerinnungsvorgängen, durch Vorlage eines Inhibitors der Fibrinolysinbildung und -wirkung (R. Marx) verhindert wurde.

Bisherige Untersuchungen über das intravasale Vorkommen von Fibrinogen und Fibrinabbauprodukten müssen unter diesem Gesichtspunkt überprüft werden; dabei muß bei der Untersuchung von Serum gesichert sein, daß die Gerinnung vollkommen war, d. h. daß kein Fibrinogen restiert.

Die durchgeführten Modellversuche konnten belegen, daß unter Plasminwirkung entstandene Fibrinabbauprodukte nur in geringem Maße im Gerinnsel inkludiert werden, so daß sie im Serum verbleiben und immunologisch qualitativ nachgewiesen werden können.

Verfeinerung des Reinheitsgrades<sup>+)</sup>  der für die Herstellung von Immunsera verwendeten Solufibrine bzw. Fibrinogen-Präparate dürfte künftig eine hohe Spezifität des Nachweises von höhermolekularen Fibrin- bzw. ungerinnbaren Fibrinogenabbauprodukten ermöglichen.

Damit könnte dann vielleicht auch die Frage der "fortlaufenden latenten Gerinnung" in vasis geklärt werden und im Serum vorhandene Fibrinabbauprodukte qualitativ bestimmt werden.

+) Anmerkung:

Auch wenn es gelingen sollte, die gewonnenen Antikörper zu reinigen, so bleibt die von Bale (37) vorgeschlagene Krebstherapie - durch lokale Bestrahlung der mit Fibrin umhüllten Tumoren mit radioaktiv beladenen Antikörpern gegen Fibrin - problematisch.

Da die Antikörper gegen Fibrin immer auch gegen Fibrinogen gerichtet sind, müsste das Blut - um eine Strahlen-Streuung zu vermeiden - defibrinogeniert werden, was bei der raschen Neogenese (80) schwierig sein dürfte. - Dazu kommt noch die Möglichkeit der "Anti-Antikörper-Bildung", was eine Wiederholung der Therapie gefährlich machte. - Nach einem Vorschlag von R. Marx ließe sich eine lokale cytostatische Therapie eventuell ermöglichen, wenn geeignete Cytostatica mit Solufibrin, in die einen Tumor versorgenden Gefäße injiziert, durch Gerinnung des Fibrins lokal festgehalten wurden.

## Verwendete Abkürzungen

|                          |                                                |
|--------------------------|------------------------------------------------|
| A . . . . .              | Arterie, Aorta                                 |
| AA- . . . . .            | Antigen-Antikörper -(Reaktion oder<br>Komplex) |
| A. dest. . . . .         | Aqua destilata                                 |
| Ag . . . . .             | Antigen                                        |
| Ak . . . . .             | Antikörper                                     |
| A. S. . . . .            | Aminosäure                                     |
| ASL-Titer . . . . .      | Antistreptolysin-Titer                         |
| Fb . . . . .             | Fibrin                                         |
| Fgen. . . . .            | Fibrinogen                                     |
| Fi . . . . .             | Fibrin insoluble                               |
| Fs . . . . .             | Fibrin soluble                                 |
| FSF . . . . .            | Fibrin stabilisierender Faktor                 |
| Ger. Zeit . . . . .      | Gerinnungszeit                                 |
| Hep . . . . .            | Heparin (bzw. Heparinoid)                      |
| k. p. B. . . . .         | kein pathologischer Befund                     |
| L-Zeit . . . . .         | Lysis-Zeit                                     |
| LL-Faktor . . . . .      | Laki-Lorand-Faktor (FSF)                       |
| M-Blut . . . . .         | Menstruations-Blut                             |
| M. G. . . . .            | Molekulargewicht                               |
| phys. NaCl . . . . .     | physiologische Kochsalzlösung                  |
| Pt-Zeit . . . . .        | Prothrombin-Zeit                               |
| re, li. . . . .          | rechts, links                                  |
| RES . . . . .            | Reticuloendotheliales System                   |
| RP-Zeit . . . . .        | Repolymerisations-Zeit                         |
| Sed. K. . . . .          | Sedimentationskonstante                        |
| Sk . . . . .             | Streptokinase                                  |
| S <sub>n</sub> . . . . . | Solu-Fibrin 1-6                                |
| Th . . . . .             | Thrombin                                       |
| tr. . . . .              | trübe                                          |
| UZ . . . . .             | Ultra-Zentrifuge                               |
| Zi. T. . . . .           | Zimmer-Temperatur                              |

### Anmerkung zu S. 107

Die Präzipitationslinien einiger Photographien und Kopien sowohl der Geldifusionsteste als der Ummunoelektrophoresen mussten dem Original angeglichen werden, da ihre Wiedergabe teilweise unscharf war.

# Literaturverzeichnis

1. Bang Nils U. , Fletcher A.P. , Alkjaersig Sherry S. : Pathogenesis of the coagulation defect developing during pathol. Plasma Proteolytic ("Fibrinolytic") States, Journal of Clin. Investigations, vol 41, 935-947, 1962
2. Behring-Werke , Zusammenstellung über "Geldiffusion nach Ouchterlony" (Brief)
3. Blombäck B. , Studies on Fibrinogen: its Purification and Conversion into Fibrin, Acta Physiol. Scandinavica, vol 43, supplem. 148, Stockholm 1958
4. Blombäck B. , Henschen A. : Umwandlungsformen des Fibrinogens. 3. Marburger Symposion für Biochemie und erblicher Proteindefekte 1961
5. Bohrod M. G. , Histology of Allergic and Related Lesions, Progress in Allergy 4, 31-78, Karger, Basel-New York 1954
6. Büchner Franz. , Allgemeine Pathologie, (Allergische Entzündung S. 383), Urban & Schwarzenberg, München-Berlin 1959
7. Derlath S. , Die direkte phasenoptische Thrombozyten- u. Reticulozytenzählung, Ärztl. Forsch. 11, 552, 1956
8. Dirr K. , Quantitatives Arbeiten in der Klinik (München 1946)
9. Doerr R. , Die Immunitätsforschung, vol.1 (1947): Antikörper (1. Teil); vol. 3 (1948): Die Antigene; vol. 4 (1949): Antikörper (2. Teil); vol. 6 (1950): Die Anaphylaxie I; vol. 7 (1951): Die Anaphylaxie II. Wien 1947-1951
10. Duckert E. , Jung E. , Shmerling D.H. : A hitherto undescribed congenital Haemorrhagic Diathesis, Probably Due to Fibrin Stabilizing Factor Deficiency, Sonderdruck: Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica, vol. V, Stuttgart 1960
11. Edsall J. T. , The Plasma Proteins and their Fractionation (Fibrinogen), Advances in Protein Chemistry, vol. 3, 405, 1952

12. Edall J. T. , Lever W.F. : Wirkung von Ionen und neutralen Molekülen auf die Fibringerinnung, J. Biol. Chem. , vol. 191, 735, Baltimore 1951
13. Engstrom R. M. , cit. nach Charles Schneider; Mechanism of Production of Acute Fibrinogen Deficiencies. Progress in Hematology, Leandro M. Tocantins, Volume, Editor I, 1956
14. Ehrlich P. , Shulman S. , Ferry J. D. : The Conversion of Fibrinogen to Fibrin (VIII); Sedimentation and Viscosity-Studies on clotting System inhibited by Urea and on Solution of Fibrin in Urea, Am. Chem. Soc. , vol. 74, 2258, 1952
15. R. Feißly u. H. Lüdín: Action de cocain sur les Plaquettes sanguines, Hev. physiol. pharmacol. Acta 7, C 9, 1949
16. Fell C. e. a. , Seegers W. H. : Differentiation of Plasma, Antithrombin Activity, Proceedings of the society for Expt. Biology and Medicine, vol. 85, 199, 1954
17. Ferry J. D. , Protein Gels, Fibrin Advances in Protein Chemistry, vol. IV, 1-74, 1948
18. Ferry J. D. , Miller M. , Shulman S. : The Conversion of Fibrinogen to Fibrin. Rigidity and Stress Relaxation of Fibrin-Clots, Effect of Ca -Jons, Arch. Biochem. and Biophys. , vol. 34, 424, New York 1951
19. Ferry J. D. , Morrison P. R. : Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins (VIII) The Conversion of Human Fibrinogen to Fibrin under various Conditions, Am. Chem. Soc. , vol. 69a, 388, 1947
20. Fieser L. F. , Fieser M. : Lehrbuch der organischen Chemie, 516, Weinheim 1960
21. Fongi E. G. e. a. : Trastornos electroliticos ocasionados por la Infusion intra venas de Urea, La Prensa Médica Argentina, vol. 48, Nr. 10, 593, Buenos Aires 1961
22. Freimann A. H. ; Cliffton E. E. : The Effect of Fibrinogen Concentration on Susceptibility of Clots to in vitro Clot Lysis with Plasmin. Thrombosis et Diathesis haemorrhagica vol. I, 1958, 269

23. Frey Joachim: Allergische Erkrankungen, Lehrbuch der Inneren Medizin v. L. Heilmeyer, 1055, 1955
24. Georgii A., Solu-Fibrin Untersuchungen, München 10.4.1961 (unveröffentlicht)
25. Gerendas M., The Inactivation and Stabilization of Thrombin, Hungar. acta physiolog., vol.I, 97, 1946
26. Gross R., Einige klinische Aspekte von Fibrinolyse und Thrombose, Behringwerk-Mitteilungen 41, 68, 1962
27. Gülzow M., Trettin H.J., Diwok K.: Experimentelles zur Wirksamkeit des Kallikrein-Trypsin-Inaktivators (Trasylol), Klinische Wochenschrift H.11, 597, 1961
28. Gutman A.B., The Plasma Proteins in Disease, Advances in Protein Chem., vol IV, 225, 1948
29. Halse Th., "Die Umwandlung des Fibrinogen zu Fibrin" von G. Köppel (1962), Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica, suppl. 2 ad vol. VII, 1962
30. Hardaway R.M., Watson H.E., Weiss F.H.: Alterations in Blood Coagulation Mechanism after Intra-Aortic Injection of Thrombin, Archiv of Surgery, vol. 81, 983, 1960
31. Hartert H., Klinische Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie. Dtsch. Arch. klin. Med. 199, 293, 1952
32. Haurowitz F., Chemie der Antigene und Antikörper, Fortschritte der Allergielehre, vol.I, 19, Basel 1939
33. Haurowitz F., Immunchemie, die Chemie der Antigene, Antikörper und ihre Reaktionen, Naturwissenschaftl. Rundschau, vol. 6, 219, Stuttgart 1961
34. Heimbürger N., Neuere Erkenntnisse über den Mechanismus der Fibrinolyse unter bes. Berücksichtigung der Fibrinagar-Elektrophorese. Behringwerk-Mitteilungen. 41, 84, 1962
35. Huggins Ch., Tapley D.F., Jensen E.V.: Sulphydryl-disulphide Relationship in the induction of gels in Protein by Urea. Nature, vol. 167, 592, London 1951

36. Isliker H. C. ,           The Chemical Nature of Antibodies, Advances in Protein Chem. XII, 387, New York 1957
37. Kade ,                   Radioaktives Fibrinogen oder Antikörper gegen Fibrin können in der Krebstherapie helfen, (Bale W. F. ), Internat. Med. Kurier 3, 1961
38. Kallos P. , Kallos-Deffner L. : Die experimentellen Grundlagen der Allergielehre, Fortschritte d. Allergielehre, vol. I, 5, 1939
39. Kallos P. , Kallos-Deffner L. : Spezifische Therapie, ebd. S. 382
40. Keckwick R. A. , Madlay M. E. , Nance M. H. , Record B. R. : The Purification of Human Fibrinogen. The Biochemical Journal vol. 60, 671, 1955
41. Laki K. ,               The Polymerisation of Proteins: The Action of Thrombin and Fibrinogen, Arch. Biochem. and Biophys., vol. 31, Nr. 1, 317, 1951
42. Laki K. , Lorand L. : On the Solubility of Fibrin Clots, Science, vol. 108, 280, Washington 1948
43. Laki K. , Gladner J. A. , Folk J. E. , Komiz DR: The Mode of action of Thrombin Thrombosis Diath. Haem., vol. II, 205, 1958
44. Landaburu R. H. , Seegers W. H. : Proteolytic and Polymerase Activity of Thrombin, Am. J. Physiol., vol. 198, 1 u. 173, 1960
45. Landsteiner K. ,       Die Spezifität der serologischen Reaktionen, 4-7, Berlin 1933
46. Laskowsky M. , Rakowitz D. H. , Scheraga H. A. : Equilibria in the Fibrinogen-Fibrin-Conversion, Am. Chem. Soc., vol. 74, 280, 1952
47. Latallo Z. S.   Fletschner A. P. , Alkjaersig N. , Sherry S. Influence of PH, ionic Strength, neutralions and Thrombin on the Fibrinpolymerization The Am. J. of Physiol., vol. 202/4, 675, 1962
48. Leuthardt F. ,       Lehrbuch der physiol. Chemie, 69. 107. 158. 577. 780, Berlin 1959

44. Loewy A. G., Edsall J. T.: Studies on the Formation of Urea-insoluble Fibrin, J. Biol. Chem., vol. 211, 828, Baltimore 1954
50. Lorand L., A Study on the Solubility of Fibrin Clots in Urea, Hungarica acta Physiol., vol. I, Budapest 1948, 192
51. Lorand L., Fibrin Clots, Nature, vol. 166, 694, 1950
52. Lorand L., Jakobsen A.: Studies on the Polymerization of Fibrin, The Role of the Globulin: FSF, J. Biol. Chem., vol. 230, 421, Baltimore 1958
53. Lüscher E. F., Ein Fibrinstabilisierender Faktor aus Thrombozyten, Schweizer Med. Wochenschrift, vol. 87, 1220, 1957
54. Marx R., Antithrombotische Therapie mit "direkten" Thrombolytica, Fortschritte der Medizin Nr. 8, 301 ff., 1962
55. Marx R., Bemerkungen zur klinischen Anwendung der gereinigten Streptokinase (Streptase), Behringwerk-Mitteilungen H. 41, 103-108, Marburg/Lahn 1962
56. Marx R., Haemostaseologie, Habilitationsschrift, pag. 88, München 1953
57. Marx R., "Solufibrin". Herstellung von Solufibrin für den i. v. Gebrauch, bes. für die Herstellung von speziellen Antikörpersera gegen Fibrin und Fibrinabbauprodukte (unveröffentlicht)
58. Marx R. u. H. Bayerle: Bestimmung von Prothrombin in kleinen Mengen Kapillarblut, Hoppe-Seyler Zschr. physiol. Chemie 283, 248, 1949
59. Marx R., Aus Dissertationen bei
  - a) R. Marx S. Kutzinsky (unveröffentlicht)
  - b) R. Marx. I. Rux "
  - c) R. Marx. K. Sasse "
60. Mihalyi E., Lorand L.: The Mechanism of the Clotting of Fibrinogen with Formaldehyd and anions Interaction between Formaldehyd and Thrombin, Hungarian acta physiol., vol. I, Nr. 1, 218, Budapest 1946

61. Morrison P. R. , Preparation and Properties of Serum and Plasma Protein XV. Some Factors Influencing the quantitative Determination of Fibrinogen, Am. Chem. Soc. 69, 2723, 1947
62. Pagel W. , Pathologie und Histologie der allergischen Erscheinungen, Fortschritte der Allergielehre vol. I, 73, 1939
63. Schlegel J. U. , nach Linzenmeier G. : Fragekasten -Antwort Münchner Med. Wochenschrift 29, 1467, 1963
64. Sandritter W. , Die path. Anatomie der Thrombose u. d. Lungen-embolie, Behringwerk-Mitteilungen. 41, 37, Marburg 1962
65. Scheraga H. A. , Laskowsky M. : The Fibrinogen-Fibrin Conversion, Advances in Protein Chemistry, vol. 12, 1-123, 1957
66. Schultze H. E. , Göllner J. , Heide K. , Schönenberger M. , Schwick G. : Zur Kenntnis der  $\alpha$ -Globuline des menschlichen Normalserums, Zeitschrift für Naturforschung, vol. 10b, 463, 1955
67. Schwick G. , a) Die Technik der Ummunoelektrophorese Labor. -Blätter 8, 11 (1958)  
b) Quantitative Methoden zur Bestimmung von Fibrinogen, Labor. -Blätter 1, 83 (1961)
68. Shulman S. , The Conversion of Fibrinogen to Fibrin. Reversible Inhibition of the Reaction, Arch. Biochem. , vol. 29, 353, 1950
69. Shulman S. , Ehrlich P. , Ferry J. D. : An Intermediate in the Conversion of Fibrinogen to Fibrin, J. Am. Soc. , vol. 73, 1388, 1951
70. Shulman S. , Ferry J. D. : The Conversion of Fibrinogen to Fibrin. Influenza of pH and Ionic strength on the clotting time and opacity, J. Phys. and colloid Chem. , vol. 54, 66, 1950
71. Shulman S. , Katz S. , Ferry J. D. : Conversion of Fibrinogen to Fibrin, Dissolution of Fibrinogen and Inhibition of clotting by various neutral salts, J. gen. Physiol. , vol. 36, 759, 1953

72. Seegers W.H., A modern Theory of Blood Clotting,  
J. Michigan State Med. Soc. , vol.55 , 272-277, 1956
73. Seegers W.H., e. a.: Thrombin-E as a (i. v.) Fibrinolytic Enzym,  
Science, -vol. 131, Nr. 3402, 726, 1960
74. Seegers W.H., Blood Coagulations, The Enzymes 2, 1106, 1951
75. Seegers W.H., Johnson J.F., Fell C.: An Antithrombin Reaction  
related to Prothrombin Activation,  
Am. J. Physiol. 176, 97, 1954
76. Seegers W.H., Yoshinari M., Landaburu R.H.:  
Antithrombin as Substrate for the Enzyme Thrombin,  
Thrombosis et Diath. Haemorrh., vol.4, 293, 1960
77. Springate C.S., Fechner R.E., Scott R.C., Jystad G.R., O'Neal R.M.:  
Disappearance of Clot-Emboli in Rabbits,  
Arch. Pathol., vol. 73, 407, 1962
78. Steiner R.F., Laki K.; Light scattering studies on the clotting of  
Fibrinogen, Arch. Biochem. and Biophys., vol. 33, 24,  
1951
79. Steiner R.F., Laki K.: Light scattering studies on Fibrinogen,  
J. Am. Chem. Soc., vol. 73, 882, 1951
80. Stirnemann H., Büchler L.: Neue Erkenntnisse über das Defibrinierungs-  
syndrom, Klin. Wochenschrift H. 24, 1281, 1961
81. Subairow D.M., Über die Thrombin-Zirkulation im Blut, Folia Haema-  
tologica vol. 79/1, 63, Leipzig 1962
82. Symposia der DAB
  - a) Roka, Lasch H. G., Witte S.,  
Über die fortlaufende latente Gerinnung in vasis.
  - b) Schultze H. E., Schwick H.,  
Über den immunologischen Nachweis von Fibrin-  
abbauprodukten therapeutischer Genese.
83. Van Zandt Hawn C., Porter U.R., The Fine Structure of clots formed  
from purified bovine Fibrinogen and Thrombin:  
a study with the Electron Microscope. J. Exp. Med.,  
vol. 86, 285, 1947
- 844 Vorlaender K.O., Ross J.: Die Agar-Gel-Diffusionsmethode in der  
Immunologie klin. Erkrankungen. Klin. Wschr. H24, 605,  
1961

85. Vorträge 1. des VII. Internat. Kongresses für Innere Medizin,  
 5. - 8. September 1962 München
- a) Dameschek W. , Boston Auto-Immunsation u. Leukämie
  - b) Heilmeyer L. , Freiburg Die Immunpathologie der  
 hämolyt. Anämien
  - c) Mischer P. A. , New York, Immunitätsvorgänge als patho-  
 genet. Faktor
  - d) Waldenström J. , Malmö, Paraproteinämien u. hämorrhag.  
 Diathesen
  - e) Deutsch E. , Wien Immunpathologie und Fibrinolyse
  - f) Lasch H. G. , Heidelberg. Blutgerinnung und Schock
  - g) Krecke H. J. , Lasch H. G. , Heidelberg,  
 Grundlagen, Diagnose u. Differen-  
 tialdiagnose des Sanarelli-  
 Schwartzman-Phänomens d. Men-  
 schen
  - h) Jorell M. M. e. a. , Mü. Proteolytische Freilegung blut-  
 drucksenkender Stoffe als Ur-  
 sache des Kreislaufkollapses
2. der 102. Versammlung d. Gesellschaft deutscher Natur-  
 forser und Ärzte. München, September 1962
- i) Wittekind D. , Pinocytose
3. 11. Tagung f. Körperflüssigk. Brügge 1963
- k) Hörmann H. , Collwitzer R. , Mü. Hexosengeh. v. Egen u. Fb.
86. Westergren A. , Blutsenkungsreaktion nach Müller-Seiffert, Taschenbuch  
 der medizinisch-klinischen Diagnostik, München
87. Winkelmann G. , Querbeck W. , Blutgerinnungsprobleme bei extrakor-  
 poralem Kreislauf, Klin. Wochenschrift H. 7, 333, 1961
88. Witte S. , Die biologische Bedeutung der Blutgerinnung b. Menschen  
 Mediz. Grundlagenforschung vol. III, Stuttgart 1960
89. Wöhlisch E. , Die Physiologie der Blutgerinnung, Verh. der Deutschen  
 Gesellsch. f. Inn. Med. u. d. Ges. d. Dt. Haematologen, Mü. 1952
90. Wöhlisch E. , Fibrinogenolyse unter dem Einfluß hydrotroper Substanzen,  
 Biochem. Zeitschr. vol. 198-299, (S. 312-319) 1938

91. Wright G. , Schomaker V. ,  
Studies on the Denaturation of Antibody  
(Kinetic Aspects of the Inactivation of Diphteria  
Antitoxin by Urea)  
Am. Chem. Soc. 70, 363, 1948
92. (Nachtrag:)  
Merril W. , Chase Ph.D. ,  
Studies on the Sensitation of Animals  
with simple Chemical Compounds,  
J. Exp. Medicine, vol. 89, 489, 1947

Herrn Professor Dr. R. Marx danke ich für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Übernahme des Referates sehr herzlich. Für die freundliche Anleitung, die großzügige Hilfe und das ermutigende Interesse während des Entstehens der Arbeit bin ich meinem verehrten Doktorvater zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Professor Dr. H. Schwiegk danke ich für die Übernahme des Coreferates.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. H. E. Schultze, Marburg, für die Durchführung der immunoelektrophoretischen, sowie Herrn Privatdozenten Dr. A. Georgii für die histologischen Untersuchungen.

Danken möchte ich auch den Mitarbeitern im Hämatologischen Labor sowie den Assistentinnen der Labors der I. Medizinischen Klinik, die mich mit Rat und Tat unterstützten.

## l e b e n s l a u f

Am 7. März 1937 wurde ich, Marlene Weinzierl, als viertes Kind des Gutsbrauereibesitzers Otto Weinzierl und seiner Ehefrau Magdalena Weinzierl, geborene Detterbeck, in Großköllnbach, Niederbay. geboren.

Nach der 5. Klasse Volksschule in Großköllnbach trat ich am 4. Oktober 1948 in das Mädchen-Realgymnasium Seligenthal in Landshut ein. Dort legte ich im Jahre 1957 die Reifeprüfung ab. Im Wintersemester 1957 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München Medizin zu studieren. Hier bestand ich im Frühjahr 1959 die naturwissenschaftliche, im Frühjahr 1960 die ärztliche Vorprüfung.

Im Jahre 1963 habe ich mein Medizinstudium mit dem Staatsexamen beschlossen.







